



HAL
open science

Etude des lésions médullaires chez la souris et le primate non-humain : l'imagerie par résonance magnétique de diffusion comme outil translationnel

Guillaume Saint-Martin

► To cite this version:

Guillaume Saint-Martin. Etude des lésions médullaires chez la souris et le primate non-humain : l'imagerie par résonance magnétique de diffusion comme outil translationnel. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2018. Français. NNT : 2018MONTTS020 . tel-02076564

HAL Id: tel-02076564

<https://theses.hal.science/tel-02076564>

Submitted on 22 Mar 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En physique

École doctorale I2S

Unité de recherche UMR5221/U1198

Etude des lésions médullaires chez la souris et le primate non-humain: l'imagerie par résonance magnétique de diffusion comme outil translationnel

**Présentée par Guillaume Saint-Martin
Le 25 juin 2018**

**Sous la direction de Christophe GOZE-BAC
et Florence PERRIN**

Devant le jury composé de

Christian ROUMESTAND, PR, Centre de Biochimie Structurale de Montpellier
Virginie CALLOT, DR, Center for Magnetic Resonance in Biology and Medicine
Patrick GAUTHIER, DR, Laboratoire de Neurosciences Sensorielles et Cognitives
Jürgen REICHENBACH, PR, Institut für Diagnostische und Interventionelle Radiologie
Christophe GOZE-BAC, DR, BioNanoNMRI – Laboratoire Charles Coulomb
Florence PERRIN, PR, Mécanismes moléculaires dans les démences neurodégénératives

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directeur de thèse
Co-Directrice de thèse



**UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER**

Remerciements

Je remercie le Pr. Jean-Michel Verdier pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire MMDN et le Dr. Pierre Lefebvre pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire Charles Coulomb, ce qui m'a permis d'être à l'interface entre la physique et la biologie.

Je remercie chaleureusement les membres de mon jury : le Pr. Christian Roumestand, le Dr. Virginie Callot et le Dr. Patrick Gauthier qui ont accepté de consacrer du temps et d'être rapporteurs pour ces travaux.

Je remercie les différents organismes qui ont participé financièrement à l'élaboration de ces travaux, avec une mention toute particulière à l'association Verticale, et à son président Monsieur Roger Philibert.

Je tiens à remercier chaleureusement le Pr. Florence Perrin, sans qui je ne serais pas en train d'écrire ces quelques dernières lignes, puisque je n'aurai pas eu la chance de participer à cette grande aventure qu'est la thèse. Tu m'as fait grandir scientifiquement, mais aussi humainement, je me sens désormais capable d'envisager la suite sereinement, ce n'aurait certainement pas été le cas sans toi. Si quelqu'un est fait pour ce travail, c'est bien toi. Certains moments resteront gravés, comme la visite de toutes les cathédrales existantes, mais aussi des parkings souterrains. Merci.

Je tiens à remercier chaleureusement le Dr. Christophe Goze-Bac. Ton organisation millimétrée est un atout sans faille, et j'ai trouvé ça génial de partager nos connaissances pour avancer vers nos objectifs. Tu m'as appris qu'un écho ne se trouve pas qu'à la montagne, et je t'ai appris que non, la moelle épinière n'est pas un « tuyau ». Ne laisse jamais personne t'enlever ta bonne humeur et ta manière d'appréhender les choses, c'est ça qui fais de toi la personne exceptionnelle que tu es. J'ai eu de la chance de partager ces années avec toi, merci beaucoup.

Je remercie le Dr. Corinne Lautier, qui m'a « poussé » dans les bras de Florence pour m'amener à cette thèse, sans toi, je ne serais pas là, et tu continues encore à m'amener de la motivation pour aller plus loin.

Je remercie le Dr. Harun Noristani, mon formateur et « grand frère » scientifique, qui aura su avec la plus grande des patiences me transmettre les techniques je maîtrise aujourd'hui. Tu es une belle personne et tu as été très important dans mes travaux. Ton « don't be sorry, be good » reste à ce jour un de mes moyens d'avancer.

Je remercie également le Dr. Yannick Gerber, personne exceptionnelle, qui est la source principale de la joie de vivre dans l'équipe. Tu m'auras fait galérer quelques fois avec entre autre des blagues fort sympathiques, mais je me rappellerai toute ma vie les moments partagés avec toi, en chirurgie, en déplacement, ou ailleurs, ou nous étions capables de parler d'évènements très personnels, ou du dernier jeu vidéo. Ta personnalité débordante pourrait faire penser le contraire, mais tu m'as amené énormément d'équilibre pendant la thèse et je t'en remercie. Je te souhaite le meilleur pour la suite, et ce n'est pas la phrase bateau que l'on dit pour faire plaisir, c'est sincère.

Je remercie également mes deux meilleures amies, Maïda Cardoso et Rahima Sidi-Boulenouar, qui m'auront amené énormément d'équilibre pendant la thèse, toujours présentes dans les moments faciles ou compliqués. Merci infiniment Maïda pour les innombrables manip avec toi, que tu as réussi à rendre moins longues, et merci pour la passion que tu voues à GOT. Rahima, ma khouya, tu es sûrement la personne la plus gentille que je connaisse, sauf quand il s'agit de prendre le dernier bout de fromage, mais ne change jamais. J'avais dit que je te dirai juste un merci rapide pour l'antenne sans laquelle je n'aurai pas pu faire d'aussi belles images, mais tu mérites beaucoup plus qu'un merci rapide, donc merci pour tout.

Je remercie Sébastien Rousset, personne exceptionnelle et voisin de bureau extraordinaire. Tu auras réussi à me prouver qu'un détachement est parfois nécessaire et ça m'a permis parfois de ne pas rendre les choses plus négatives qu'elles ne l'étaient. Les grandes discussions que nous avons eues, sur à peu près tout d'ailleurs, m'ont permis d'ouvrir mon esprit à autre chose que mes travaux de thèse, et ça a été très bénéfique.

Je remercie le Dr. Christophe Coillot, qui après un travail acharné, a réussi à me faire prendre conscience de pas mal de choses de la vie quotidienne. Mon comportement sur certaines choses a changé, en bien je pense et je t'en remercie.

Je remercie Marisa Teigell pour ta douceur et ta gentillesse, pour ton aide précieuse et le Dr. Sylvain Bartolami pour ses commentaires judicieux.

Je remercie Dr. Gaétan Poulen pour avoir répondu à toutes mes questions sur la réalité de la clinique, qui sont restées longtemps floues avant son arrivée. J'espère que nous arriverons à travailler ensemble dans le futur, avoir un clinicien efficace comme toi est un atout pour une équipe.

Je remercie toute l'équipe du Bionano, Éric Alibert pour son aide précieuse sur les antennes et sur les discussions rugby, le Dr. Éric Nativel pour sa bonne humeur et ses connaissances inépuisables en électronique, tous les étudiants agronomes, électroniciens, ou biologistes passés par la plateforme qui ont tous amené de la bonne humeur à leur passage, sans oublier le Dr. Michel Zanca pour ses précieux conseils scientifiques.

Je remercie les étudiantes que j'ai encadré, Marion Clé et Claire Bringuier, toutes les deux en thèse aujourd'hui, pour leur bonne humeur et surtout pour m'avoir permis d'améliorer mon enseignement et ma transmission, que j'affectionne tout particulièrement.

Je remercie tous mes coéquipiers de l'équipe de rugby de Jacou, qui, même s'ils ne comprennent pas que je doive arrêter de jouer pour « écrire un truc », m'auront donné l'opportunité de penser à autre chose qu'à ma thèse pendant ces 3 dernières années. J'ai passé des moments inoubliables avec eux et je suis content d'avoir arrêté ce sport, qui m'a passionné pendant 18 ans, à leurs côtés.

Je n'oublie pas ma famille, que je dois remercier particulièrement pour leur patience quand mon travail influençait mon humeur avec eux les week-ends ou j'arrivai à me rendre disponible. Je remercie mes parents pour leur soutien depuis la prise de décision de se lancer dans la thèse, jusqu'à aujourd'hui. Je remercie également mes deux frères Sébastien et Julian, qui sans connaître mon domaine professionnel, m'ont donné de précieux conseils et m'ont encouragé.

Je remercie mes amis pour leur patience lorsque j'ai été indisponible, et pour leurs conseils. Je remercie tout particulièrement Tristan Rubio, mon ami fidèle depuis plus de 7 ans (donc pour la vie) qui est passé par « l'épreuve » de la thèse juste avant moi et qui m'a donné des conseils et des encouragements dont je me rappellerai longtemps.

Enfin, je me remercie la personne la plus importante dans l'aboutissement de cette thèse, même si elle n'y a pas participé directement, Jennifer, ma compagne. Tu as réussi à me supporter, épreuve particulièrement difficile par période, ce qui est une belle preuve d'amour. Je souligne tout de même que j'ai réalisé le même exploit puisque tu as aussi rencontré des difficultés dans ta fin d'études. Je suis sûr qu'on se dirige vers un bel avenir professionnel et personnel maintenant, on l'aura bien mérité.

Table des matières

Remerciements	2
Table des matières	5
Publications et communications scientifiques	9
Liste des abréviations	11
Introduction	13
Contexte et hypothèses	13
Structure du manuscrit	16
1. Généralités	17
1.1 Le système nerveux	17
1.1.1 L'encéphale	18
1.1.2 La moelle épinière.....	19
1.1.3 Les cellules du système nerveux central	21
1.1.4 Le système nerveux central du petit animal	27
1.2 Les lésions de la moelle épinière	28
1.2.1 Incidence des lésions de la moelle épinière.....	29
1.2.2 Physiopathologie	29
1.2.3 Déplétion transitoire de la microglie	31
1.2.4 Modèles expérimentaux de lésion médullaire	32
1.3 L'imagerie par résonance magnétique	39
1.3.1 Le magnétisme	39
1.3.2 Interaction du proton avec le champ magnétique	40
1.3.3 Résonance magnétique nucléaire (RMN).....	42
1.3.4 Temps de relaxation T1 et T2.....	49
Pour aller plus loin dans la description de la dynamique des spins nucléaires, on utilise des équations de Bloch pour un spin ½ comme le proton (voir Annexe 2).	52
1.3.5 Temps de répétition et temps d'écho.....	53
1.3.6 Du signal à l'image, le codage spatial	56
1.3.7 Séquences.....	62
1.3.8 L'IRM sur les modèles animaux après une lésion médullaire.....	69
1.4 Objectifs de la thèse	72
1.4.1 Comparaison de deux souches de souris avec l'IRM <i>in vivo</i> , l'IRM <i>ex vivo</i> et l'histologie	72
1.4.2 Evaluation avec l'IRM de diffusion d'une stratégie thérapeutique	72
1.4.3 Mise au point d'un modèle de lésion médullaire sur le primate non humain	72
2. Matériel et méthodes	73
2.1 Animaux	73

2.2	Protocole chirurgical – Lésion de la moelle épinière.....	76
2.3	Préparation des tissus pour les études <i>ex vivo</i>	77
2.3.1	Perfusion intracardiaque.....	77
2.3.2	Dissection – Prélèvement de la moelle épinière	77
2.3.3	Congélation et coupe au cryostat.....	78
2.4	Etude comportementale.....	78
2.4.1	CatWalk™.....	79
2.4.2	Open field.....	81
2.5	Acquisition IRM.....	84
2.5.1	Détermination des paramètres IRM optimaux.....	84
2.5.2	Protocole IRM pondérée T2 <i>in vivo</i>	95
2.5.3	Protocole IRM pondérée T2 <i>ex vivo</i>	97
2.5.4	Protocole IRM pondérée diffusion <i>ex vivo</i>	98
2.5.5	Protocole IRM pondérée diffusion <i>in vivo</i>	99
2.5.6	« Dicomisation » et traitement des images.....	100
2.5.7	Evaluation de la qualité du signal.....	101
2.6	Etude histochimique	103
2.6.1	Marquage bleu de toluidine	103
2.6.2	Immunohistochimie.....	104
2.6.3	Analyse de l'immunohistochimie	107
2.7	Déplétion de la microglie	108
2.7.1	Injection de BrdU	108
2.7.2	Approche expérimentale.....	109
2.8	Mise au point d'un modèle de lésion médullaire sur un primate non-humain	111
2.8.1	Animaux.....	111
2.8.2	Hémisection latérale.....	111
2.8.3	Etude comportementale.....	112
2.8.4	Suivi longitudinal en IRM <i>in vivo</i> pondérée T2	114
2.8.5	IRM <i>ex vivo</i> pondérée T2	115
2.8.6	Mini-Atlas de la colonne vertébrale et de la moelle épinière de <i>Microcebus murinus</i>	115
2.8.7	Analyse histologique de la lésion de la moelle épinière chez <i>M. murinus</i>	116
2.9	Analyses statistiques	117
2.10	Présentation des résultats	118
3.	Résultats expérimentaux	121
3.1	Suivi comportemental : comparaison des souches de souris CX3CR1 et Aldh1l1	121
3.1.1	Evolution pondérale	121
3.1.2	Coordination de la marche	122
3.1.3	Support des pattes.....	124
3.1.4	Activité et anxiété.....	125
3.1.5	Sensibilité tactile.....	127

3.2 Caractérisation des temps T1 et T2 la moelle épinière à 9.4T	129
3.2.1 Temps T1 et T2 <i>ex vivo</i>	129
3.2.1 Temps T1 et T2 <i>in vivo</i>	129
3.3 Suivi longitudinal en IRM <i>in vivo</i> pondérée en T2 : comparaison des souris CX3CR1 et Aldh111 131	
3.3.1 Qualité du signal en IRM <i>in vivo</i> pondérée en T2	131
3.3.2 Quantification de la lésion en IRM <i>in vivo</i> pondérée en T2	134
3.4 Utilisation de l'IRM <i>ex vivo</i> pondérée en T2 et de l'histologie : comparaison des souris CX3CR1 et Aldh111	138
3.4.1 Qualité du signal en IRM <i>ex vivo</i> pondérée en T2	138
3.4.2 Quantification de la lésion en IRM <i>ex vivo</i> pondérée en T2	140
3.4.3 Quantification de la lésion en histologie	142
3.4.4 Comparaison des observations faites en IRM <i>in vivo</i> pondérée en T2, en IRM <i>ex vivo</i> pondérée en T2 et en histologie	144
3.5 Amélioration de l'IRM <i>ex vivo</i> pondérée en T2 avec une antenne dédiée	146
3.5.1 Qualité du signal en IRM <i>ex vivo</i> pondérée en T2 avec l'antenne dédiée	146
3.5.2 Quantification de la lésion en IRM <i>ex vivo</i> pondérée en T2 en utilisant l'antenne dédiée	150
3.6 Utilisation de l'IRM <i>ex vivo</i> pondérée en diffusion : comparaison des souris CX3CR1 et Aldh111 152	
3.6.1 Qualité du signal en IRM <i>ex vivo</i> pondérée en diffusion	152
3.6.2 Quantification de la lésion en IRM <i>ex vivo</i> pondérée en diffusion	155
3.6.3 Mise au point de la segmentation automatique et calcul de coefficient de diffusion apparent parallèle aux axones	160
3.6.4 Quantification de la lésion en histologie	164
3.6.5 Comparaison des observations faites en IRM <i>ex vivo</i> pondérée en diffusion et en histologie	164
3.7 Suivi longitudinal en IRM <i>in vivo</i> pondérée en diffusion : comparaison des données obtenues pour les souris CX3CR1 et Aldh111	168
3.7.1 Qualité du signal en IRM <i>in vivo</i> pondérée en diffusion	168
3.7.2 Quantification de la lésion en IRM <i>in vivo</i> pondérée en diffusion	171
3.7.3 Quantification de la lésion en IRM <i>ex vivo</i> pondérée en diffusion	178
3.7.4 Quantification de la lésion en histologie	179
3.7.5 Comparaison des observations faites dans le suivi longitudinal IRM <i>in vivo</i> pondérée en diffusion, en IRM <i>ex vivo</i> pondérée en diffusion et en histologie	179
3.8 Réactivité gliale entre les souris CX3CR1 et Aldh111	181
3.8.1 Microglie et astrocytes	182
3.8.2 Sérotonine	187
3.9 Application thérapeutique expérimentale : déplétion transitoire de la prolifération de la microglie chez la souris	189
3.9.1 Diminution de la prolifération microgliale	190
3.9.2 Analyse comportementale	191

3.9.3	Mesure du volume lésionnel en IRM pondérée en diffusion <i>in et ex vivo</i> et en histologie	193
3.9.4	Mesure du coefficient de diffusion apparent parallèle	194
3.9.5	Réactivité gliale.....	196
3.9.6	Cavitations.....	198
3.10	Mise au point d'un nouveau modèle de lésion de la moelle épinière sur le primate non-humain	
	200	
3.10.1	Caractérisation neuroanatomique de la moelle épinière de <i>Microcebus murinus</i>	200
3.10.2	Caractérisation de la répercussion motrice d'une hémisection latérale de la moelle épinière chez <i>Microcebus murinus</i>	205
3.10.3	IRM <i>in vivo</i> et <i>ex vivo</i> pondérée en T2	208
3.10.4	Réactivité gliale après une hémisection latérale de la moelle épinière chez <i>Microcebus murinus</i>	211
	CONCLUSION GENERALE	215
	Annexe 1 – Ouverture à la clinique	217
	Annexe 2 – Equations de Bloch	225
	Références	228
	Abstract.....	242
	Résumé	243

Publications et communications scientifiques

2015

- GRISBI 2015, Montpellier (Présentation orale et poster)

2016

- Workshop CENIR MRI ICM 2016, Paris (Poster)
- Journée des Neurosciences 2016 Montpellier (Présentation orale)

Christophe Coillot, Rahima Sidiboulouar, Eric Nativel, Michel Zanca¹, Eric Alibert, Maida Cardoso, **Guillaume P. Saint-Martin**, Harun Noristani, Nicolas Lonjon, Marine Lecorre, Florence Perrin, and Christophe Goze-Bac. Signal modeling of an MRI ribbon solenoid coil dedicated to spinal cord injury investigations. *J sensor and sensor system*. 5, 137–145.

2017

- GLIA 2017, Edinburg (Poster)
- ESMRBM 2017, Barcelona (Présentation orale)
- Society for Neuroscience 2017, Washington (Poster)

Marine Le Corre, Harun N. Noristani, Nadine Mestre-Frances, **Guillaume P. Saint-Martin**, Christophe Coillot⁵, Christophe Goze-Bac, Nicolas Lonjon, Florence E. Perrin A Novel Translational Model of Spinal Cord Injury in Nonhuman Primate. *Neurotherapeutics*. doi: 10.1007/s13311-017-0589-9.

Harun N. Noristani, Hassan Boukhaddaoui, **Guillaume P. Saint-Martin**, Pauline Auzer, Rahima Sidiboulouar, Nicolas Lonjon, Eric Alibert, Nicolas Tricaud, Christophe Goze-Bac, Christophe Coillot and Florence E. Perrin. A Combination of *ex vivo* diffusion MRI and multiphoton to study microglia/monocytes alterations after spinal cord injury. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 9:230. doi: 10.3389/fnagi.2017.00230.

2018

***Guillaume Patrick Saint-Martin**, *Harun Najib Noristani, Maïda Cardoso, Rahima Sidiboulouar, Matthias Catteau, Christophe Coillot, §Christophe Goze-Bac, and Florence Evelyne Perrin. Longitudinal MRI analysis and histological characterization after spinal cord injury in two mouse strains with different functional recovery: gliosis as a key factor. *Journal of Neurotrauma*.

Soumis:

***Guillaume Patrick Saint-Martin**, *Yannick Nicolas Gerber, Claire Mathilde Bringuier, Sylvain Bartolami, Christophe Goze-Bac, Harun Najib Noristani and *Florence Evelyne Perrin. Reduction of microglia proliferation through CSFR1 targeting improves motor recovery following spinal cord injury. *Frontiers in Cellular Neuroscience*.

En preparation:

Guillaume Patrick Saint-Martin, Harun Najib Noristani, Cardoso Maïda, Christophe Coillot, Rahima Sidiboulouar, Christophe Goze-Bac and Florence Evelyne Perrin. Differential lesion evolution after spinal cord injury identified by diffusion-weighted MRI in two mouse strains with different functional recovery.

Liste des abréviations

5HT : 5-hydroxytryptamine
ADC : apparent diffusion coefficient
ADN : acide desoxyribonucléique
Aldh111: Aldehyde dehydrogenase 1 family member L1
AUC : area under curve
AVG: average
BrdU: bromodésoxyuridine
BSA : bovine serum albumin
CNR : ratio contraste sur bruit
CPMG: séquence Carr Purcell Meiboom Gill
CSF1: colony stimulating factor 1
CSF1R: colony stimulating factor 1 receptor
DAB: diaminobenzidine
DO: densité optique
DWI: diffusion-weighted imaging
DTI: diffusion tensor imaging
ECG: électrocardiogramme
eGFP: enhanced green fluorescent protein
EPI: echo planar imaging
FA: fractional anisotropy
FACS: fluorescence activated cell sorting
FOV: field of view
FID: free induction decay
FSEMS: fast spin echo multi slice
GABA: acide gamma-aminobutyrique
Gap : espace entre les coupes
GEMS : gradient echo multi slice

GFAP: glial fibrillary acidic protein
HCl : acide chloridrique
HS: hémisection
IBA1: ionized calcium binding adaptor molecule 1
IRM: imagerie par resonance magnétique
LCR : liquide céphalo-rachidien
LME: lésion de la moelle épinière
MEMS: multi echo multi slice
NE: nombre d'échos
PBS : phosphate buffered salin
PFA : paraformaldéhyde
RMN: résonance magnétique nucléaire
RF: radiofréquence
RGB : rouge, bleu, vert (codage couleur)
Rs : corrélation de Spearman
SEMS: spin echo multi slice
SERT: serotonin 5HT transporter
SNC: système nerveux central
SNP: système nerveux périphérique
SNR : ratio signal sur bruit
T9: thoracique 9
TE: temps d'écho
Thk : thickness, épaisseur des coupes
TR: temps de repetition
UA : unité arbitraire

Introduction

Contexte et hypothèses

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est devenue un outil clé pour étudier *in vivo* l'anatomie et les fonctions du système nerveux central. En plus d'identifier les structures cérébrales et les réseaux fonctionnels endommagés spécifiquement dans différentes pathologies, les équipes de recherche travaillent désormais à identifier avec l'IRM les mécanismes physiopathologiques impliqués à l'échelle tissulaire voire même cellulaire. La communauté développe de nouvelles méthodes allant au-delà de l'utilisation des contrastes en IRM pondérées en T1 et en T2, qui ne sont pas quantitatifs et qui ne permettent pas toujours de caractériser précisément la pathologie étudiée. L'IRM de diffusion est une technique qui consiste à étudier le déplacement des spins des protons dans l'organisme. Cette technique d'imagerie permet de caractériser l'environnement tissulaire et cellulaire. En effet, la présence de barrières naturelles telles que les membranes cellulaires contraint la diffusion des molécules d'eau et fournit des informations uniques sur l'organisation de la structure tissulaire. L'IRM de diffusion est utilisée pour évaluer l'organisation des axones myélinisés dans le système nerveux central (SNC), puisque la possibilité que les molécules se déplacent dans la direction des axones est beaucoup plus élevée que dans les autres directions, ce qui permet notamment d'évaluer l'intégrité anatomique du tissu nerveux (Fraidakis et al. 1998; Bonny et al. 2004).

Dans ce contexte, nous avons décidé de mettre à profit les propriétés de l'IRM de diffusion pour obtenir une meilleure identification du volume lésionnel résultant d'une lésion de la moelle épinière. En effet, les substances grise et blanche de la moelle épinière ayant des propriétés physiques différentes, et comme l'on déjà démontré plusieurs équipes (Callot et al. 2010; Bonny et al. 2004) les contrastes entre les différentes régions d'intérêt de la moelle épinière sont supérieurs lorsque l'on applique un gradient de diffusion le long des axones par rapport aux images obtenues après pondération en T1 ou en T2. De plus, afin d'améliorer les acquisitions en IRM *ex vivo*, notre équipe a mis au point une antenne dédiée, permettant un meilleur facteur de remplissage et donc un meilleur rapport signal sur bruit. Nous espérons grâce à cette amélioration et aux propriétés de l'IRM de diffusion obtenir une identification plus aisée de la lésion comparativement aux études précédentes effectuées en pondérant les images en T2.

Deux souches de souris couramment utilisées (Swiss et C57Bl/6) au sein de notre laboratoire présentent une différence de récupération fonctionnelle après une hémisection latérale de la moelle épinière. Ce travail de thèse s'est intéressé à effectuer un suivi longitudinal en IRM afin d'évaluer la sensibilité de ce type d'imagerie et d'observer une possible différence de réponse au traumatisme médullaire entre les deux souches de souris. Nous avons décidé de mesurer le volume lésionnel grâce à l'IRM *in vivo* et *ex vivo*. Dans un premier temps, et afin de sélectionner correctement les paramètres d'acquisitions IRM, nous avons caractérisé les propriétés physiques des différents tissus de la moelle épinière de souris après une lésion dans notre appareil IRM dont le champ magnétique est de 9.4T. Dans un deuxième temps, nous avons mis en place un suivi longitudinal permettant d'évaluer l'évolution du volume lésionnel au cours du temps chez les deux souches de souris. L'IRM de diffusion a été choisie comme un outil d'identification anatomique de la lésion et nous avons évalué l'intégrité axonale des tissus en *ex vivo* à l'aide de la mesure de la diffusivité axiale. Ensuite, afin d'évaluer la compatibilité des informations recueillies en IRM, nous avons mesuré le volume lésionnel en effectuant des colorations sur des coupes de moelle épinière. Enfin, la réactivité des cellules gliales étant liée à la formation de la cicatrice gliale, les études IRM ont été complétées par des comparaisons immunohistochimiques qualitatives et quantitatives de la réactivité gliale des deux souches de souris.

En parallèle, une stratégie thérapeutique de modulation de la cicatrice gliale par traitement pharmacologique a été mise en place. Ce traitement limite la prolifération des microglies, cellules participant à la formation de la cicatrice gliale après un traumatisme de la moelle épinière. Notre hypothèse est que la diminution du nombre de microglies proliférantes pourrait rendre l'environnement plus favorable à la repousse des axones en limitant l'influence de facteurs pro-inflammatoires. En parallèle à l'évaluation de l'effet du traitement sur la récupération fonctionnelle grâce à des tests comportementaux, nous avons mis en place une évaluation de l'évolution du volume lésionnel en IRM *in vivo* chez les animaux traités et non-traités. Nous avons ensuite utilisé l'IRM *ex vivo* pondérée en diffusion pour obtenir un indice de l'effet du traitement sur l'intégrité des axones en évaluant la diffusivité axiale des tissus. Puis, afin de vérifier la compatibilité des résultats obtenus en IRM et en histologie, nous avons effectué des marquages histologiques. Enfin, la réactivité gliale des souris traitées et non traitées a été quantifiée afin de connaître l'effet de la molécule et d'éventuellement identifier un éventuel lien entre la réactivité des cellules de la glie et une récupération fonctionnelle.

En parallèle de nos études sur la souris, ce travail a permis de mettre en place un nouveau modèle de lésion médullaire. Un bon modèle doit présenter des caractéristiques anatomiques similaires à l'Homme, reproduire au mieux la pathologie décrite en clinique, être reproductible et enfin être disponible, nous avons donc choisi un primate non-humain, le *Microcebus murinus*. L'objectif était donc de mettre au point et de caractériser un modèle chirurgical de lésion médullaire chez le *Microcebus murinus* avec des analyses histopathologiques et comportementales implémentées d'une étude longitudinale détaillée par IRM avec à terme la possibilité d'établir une comparaison des mécanismes physiopathologiques des lésions médullaires chez le primate non-humain et chez l'Homme.

Structure du manuscrit

Le manuscrit aborde trois aspects distincts mais étroitement connexes permettant de regrouper toutes les méthodes utilisées dans une seule grande partie. Ce format permet de discuter tous les résultats directement après leur présentation avant de terminer sur une conclusion générale. Le manuscrit est organisé en 4 parties et comporte une annexe :

- Généralités :

Cette partie expose le contexte général de la thèse, l'utilisation de l'IRM dans le cadre de l'étude des lésions médullaires chez l'Homme et le petit animal.

- Matériels et Méthodes :

Cette partie présente toutes les méthodes utilisées dans les 3 études exposées dans ce travail de thèse. Mes travaux s'intègrent dans les axes généraux de recherche des laboratoires de physique et de Neurosciences, non seulement sur la mise au point, l'acquisition et l'exploitation des images IRM, mais aussi sur les chirurgies et les acquisitions et analyses immunohistochimiques. Mon implication dans les méthodes d'évaluation comportementale a consisté en l'exploitation statistique des données recueillies, qui ont ensuite pu être comparées aux résultats obtenus en IRM et en histologie.

- Résultats expérimentaux :

Cette partie présente les résultats obtenus dans (1) une étude comparant deux souches de souris qui présentent une récupération différente après une lésion médullaire, (2) l'évaluation d'une stratégie thérapeutique de déplétion de la prolifération de la microglie induite par une lésion médullaire, et (3) dans la mise au point d'un modèle lésionnel sur le primate non humain sont présentés. Nous avons fait le choix de discuter les résultats directement après leur présentation, dans cette même partie.

- Conclusion générale :

Cette partie résume les résultats significatifs de chacune des trois problématiques, sous forme de conclusion globale.

1. Généralités

1.1 Le système nerveux

Le système nerveux est composé de deux parties, le système nerveux central (SNC) et le système nerveux périphérique (SNP).

Le SNC est composé de l'encéphale (cerveau, tronc cérébral, cervelet) localisé dans la boîte crânienne et de la moelle épinière, localisée dans le canal rachidien. L'encéphale et la moelle épinière sont les centres de régulation et d'intégration de l'information qui provient de la périphérie, mais aussi de la réponse à lui transmettre. La moelle épinière conduit l'information motrice provenant de l'encéphale et transmet les influx nerveux aux muscles squelettiques. Elle a un rôle de récepteur, puis de relais des informations sensibles provenant de la peau ou des viscères vers l'encéphale. Finalement, la moelle épinière est également impliquée dans les réactions dites réflexes.

Le système nerveux périphérique est composé des nerfs crâniens et des nerfs spinaux, qui sont reliés au système nerveux central. Son rôle est de constituer des lignes de communication entre le système nerveux central et le reste de l'organisme. Il possède des voies sensibles afférentes par lesquelles il propage les influx nerveux provenant des récepteurs sensibles vers le SNC et des voies motrices efférentes par laquelle il propage des influx provenant du SNC vers les effecteurs que sont les muscles et les glandes (Fig. 1).

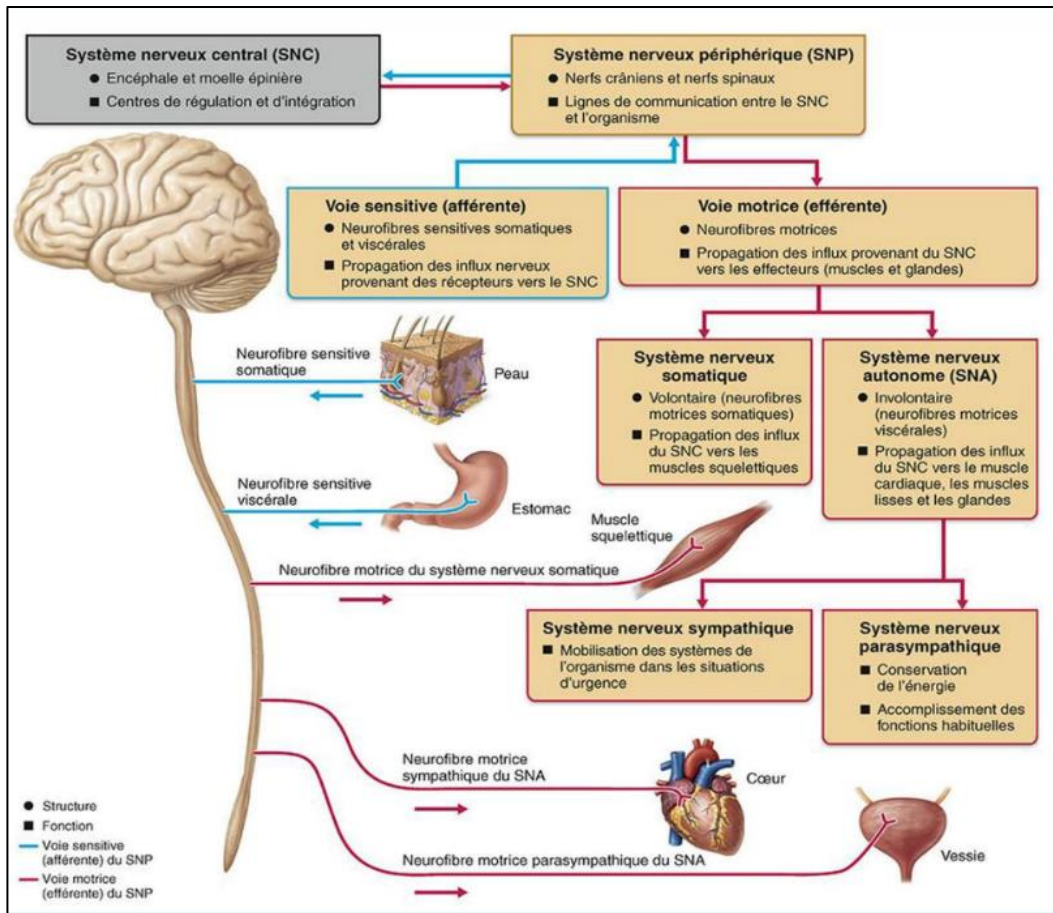


Figure 1 : Organisation du système nerveux central et du système nerveux périphérique. (Marieb E. N., 2010 « Anatomie et physiologie humaines », Pearson).

1.1.1 L'encéphale

L'encéphale est constitué du cerveau, du cervelet et du tronc cérébral (Fig. 2).

Le cerveau est la plus grande partie de l'encéphale, associée à une fonction cérébrale supérieure telle que la pensée et l'action. Le cerveau est composé de deux hémisphères qui sont eux-mêmes divisés en quatre sections, appelées « lobes »: le lobe frontal, le lobe pariétal, le lobe occipital et le lobe temporal. Le cervelet est semblable au cerveau puisqu'il possède deux hémisphères et a une surface fortement repliée. Cette structure est associée à la régulation et à la coordination du mouvement, de la posture et de l'équilibre. Localisé sous la face inférieure du cerveau, le tronc cérébral est responsable des fonctions vitales de base telles que la respiration, le rythme cardiaque et la pression artérielle. Les nerfs crâniens partent du tronc cérébral (à l'exception des nerfs optiques et olfactifs).

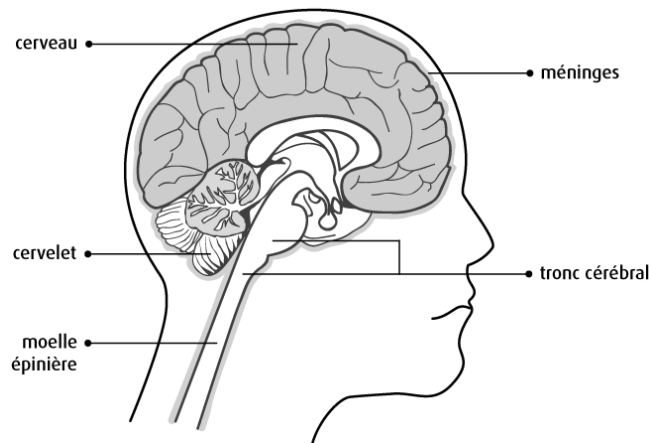


Figure 2 : Organisation de l'encéphale. (Adapté du site de la société canadienne du cancer).

1.1.2 La moelle épinière

La moelle épinière forme le prolongement du tronc cérébral et s'étend chez l'Homme jusqu'à la première ou deuxième vertèbre lombaire, elle est localisée dans le canal vertébral qui s'étend du trou occipital jusqu'au sacrum (Fig. 3). Chez l'Homme, elle a une longueur de 40 à 50 cm et un diamètre de 1 cm à 1,5 cm. Deux rangées consécutives de racines nerveuses antérieures et postérieures émergent sur chacun de ses côtés. Ces racines nerveuses se rejoignent distalement pour former 31 paires de nerfs spinaux de chaque côté du canal vertébral (8 cervicales, 12 dorsales, 5 lombaires, 5 sacrées, 1 coccygienne). Le segment cervical contrôle la partie haute du corps, dont le diaphragme ; le segment thoracique innerve les muscles du tronc et les membres supérieurs ; le segment lombaire contrôle les muscles abdominaux et les membres inférieurs. Enfin les nerfs sacrés vont innerver une partie des membres inférieurs et les sphincters. De plus, la moelle épinière est impliquée dans les réflexes indispensables à la motilité et au fonctionnement viscéral.

Après la première vertèbre lombaire, la moelle épinière finit par le cône médullaire terminal d'où émergent les dernières racines des nerfs spinaux issus de la moelle lombaire et sacrée sur une longueur d'environ 3 centimètres. Les racines terminales forment la queue de cheval, tandis que le filum terminal, qui est une structure fibreuse, prolonge la moelle épinière jusqu'au coccyx.

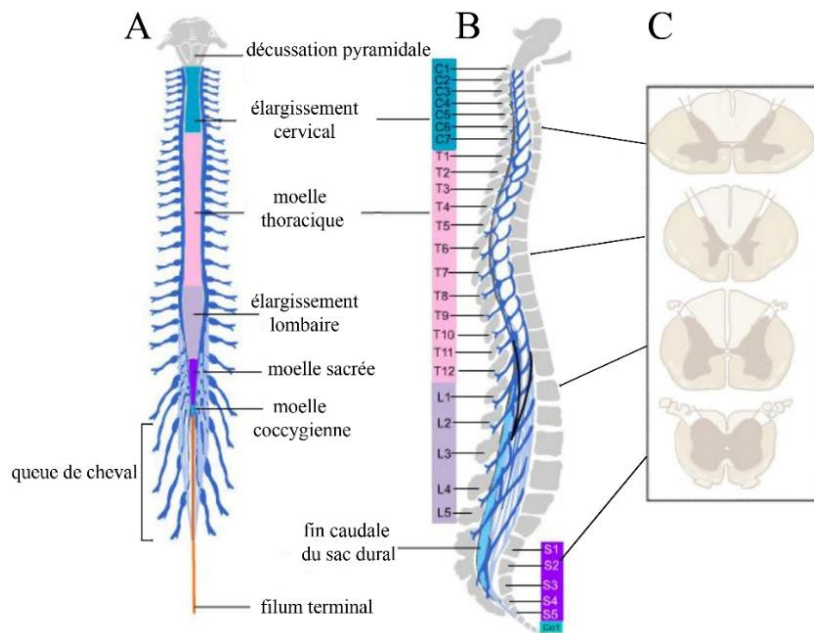


Figure 3 : Organisation de la moelle épinière. Illustration de la moelle épinière avec ses racines spinales (A). Illustration des vertèbres (B) et de la moelle épinière en vue transversale au niveau cervical, thoracique, lombaire et sacré (C). (Adapté du site de "University of Texas Health Science Center of Houston").

La moelle épinière est entourée de méninges composées de la pie-mère, qui est un tissu conjonctif vascularisé, d'un feuillet arachnoïdien, qui, comme son nom l'indique, est une membrane molle avasculaire ressemblant à une toile d'araignée et enfin de la dure-mère qui permet le passage des racines nerveuses (Fig. 4).

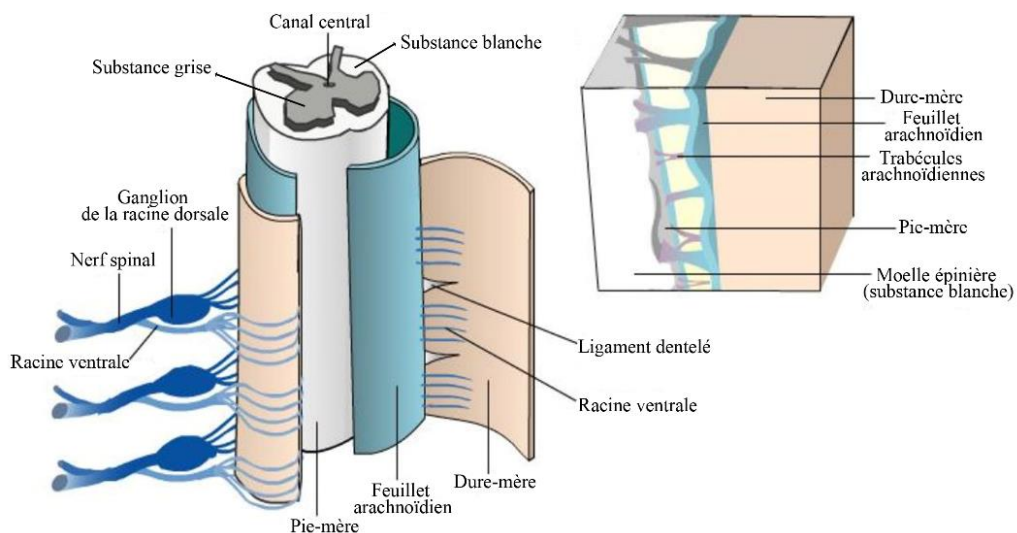


Figure 4 : Structure de la moelle épinière. (Adapté de "University of Texas Health Science Center of Houston").

La moelle épinière est constituée de la substance grise au centre en forme de papillon et de la substance blanche autour (Fig. 4). Dans la substance grise se trouvent des cellules gliales et les

corps cellulaires des neurones, c'est donc une partie très compacte dont le rôle est d'intégrer et de relayer l'information. La substance blanche est constituée des axones myélinisés et des cellules gliales formant une structure fibreuse, son rôle est de conduire l'influx nerveux.

1.1.3 Les cellules du système nerveux central

a) Les neurones

Les neurones sont les cellules qui initient, reçoivent, déchiffrent et transmettent l'information. Leur particularité provient du fait qu'ils sont excitable et sécréteurs, ce qui leur permet de fonctionner en réseau. En effet, un neurone ne peut conduire l'information seul, il doit donc s'intégrer dans un réseau complexe de neurones qui vont ensemble recevoir, modifier et transmettre un signal. Les neurones sont composés d'un corps cellulaire, de multiples prolongements courts (plusieurs milliers) appelés les dendrites et d'un prolongement généralement plus long, l'axone, au bout duquel se trouve le bouton terminal. Le corps cellulaire et les dendrites forment la partie réceptrice du neurone, tandis que l'axone et les boutons terminaux sont très majoritairement la partie émettrice (Fig. 5). Il existe toutefois des neurones sur lesquels il y a une afférence sur le bouton terminal.

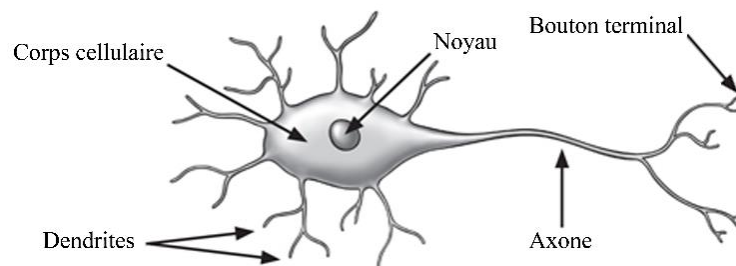


Figure 5 : Illustration de la structure d'un neurone. (Adapté de « Comment fonctionne le cerveau ? », Thierry Soucar Editions)

L'information entre les neurones se fait par l'intermédiaire de neurotransmetteurs, qui sont des messagers chimiques libérés au niveau d'une structure spécialisée appelée synapse, entre le bouton terminal du neurone transmetteur (présynaptique) et la dendrite du neurone récepteur (postsynaptique) (Fig. 6).

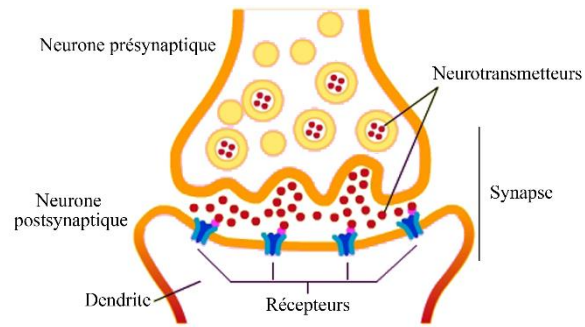


Figure 6 : Illustration des échanges entre un neurone présynaptique et un neurone postsynaptique (Adapté du site *Electro-Santé*).

Chaque neurone est unique et présente une forme spécifique selon sa position dans le système nerveux et selon les interactions qu'il va avoir avec les autres neurones, mais aussi avec les cellules sensorielles ou effectrices de l'organisme. Dans le cadre de l'étude des lésions de la moelle épinière, nous nous intéresserons plus précisément aux neurones moteurs.

Les neurones moteurs contrôlent les mouvements du corps. Ils sont directement connectés à une cellule musculaire et vont permettre de commander sa contraction. Ils agissent sur un nombre variable de fibres musculaires. On appelle unité motrice, l'ensemble regroupant un neurone moteur et les fibres musculaires qu'il innerve.

Il existe deux types de neurone moteur, les centraux et les neurones moteurs de la corne ventrale parfois appelés « périphériques » (appelé également « motoneurones »). Tous les neurones moteurs centraux sont localisés principalement dans le cortex moteur et le tronc cérébral. Ils induisent donc la transmission de l'ordre de mouvement vers la moelle épinière où se situent les neurones moteurs « périphériques ». Les motoneurones périphériques sont directement reliés aux muscles auxquels ils vont transmettre l'ordre de mouvement. Ainsi, les motoneurones situés au niveau cervical de la moelle épinière vont contrôler les muscles des membres supérieurs et le diaphragme tandis que ceux situés dans la moelle lombaire vont contrôler les muscles des membres inférieurs. Les neurones moteurs localisés dans le tronc cérébral vont entre autre contrôler l'ensemble des muscles de la face.

Pour transmettre l'ordre de contraction au muscle, le motoneurone libère de l'acétylcholine qui va se lier aux récepteurs postsynaptiques du muscle (Fig. 7). Tous les neurones moteurs des vertébrés sont dits cholinergiques car l'information nerveuse est transmise via l'acétylcholine (McGeer et al. 1974).

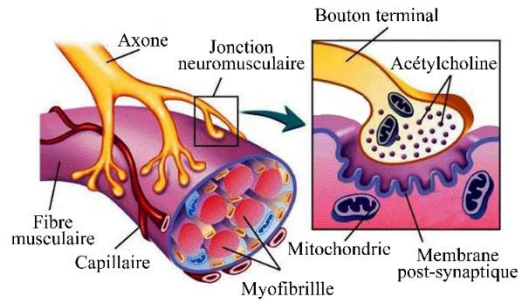


Figure 7 : Illustration de la structure de la jonction neuromusculaire permettant la transmission de l'ordre de mouvement du nerf vers le muscle (Adapté de Marieb E. N. (2010) « Anatomie et physiologie humaines », Pearson).

b) Les cellules gliales

Les cellules gliales sont présentes dans l'ensemble du système nerveux central et assurent plusieurs rôles. Elles sont un tissu de soutien aux cellules transmettrices de l'information nerveuse et fournissent l'oxygène et les nutriments nécessaires aux neurones. Pour cela, les cellules gliales forment un relais entre le système sanguin et les neurones. Elles jouent aussi un rôle prépondérant dans la protection des neurones contre d'éventuelles pénétrations de pathogènes dans le système nerveux central. Ces cellules permettent aussi une stabilisation de l'homéostasie dans le système nerveux. Les cellules gliales sont divisées en deux groupes : la microglie et la macroglie (astrocytes et oligodendrocytes).

La microglie

La microglie est la cellule immunocompétente résidente du système nerveux central, jouant un rôle proche du macrophage. Son rôle est de détecter rapidement des molécules du non soi ou des molécules du soi devenues néfastes (cancer) ou non fonctionnelles. Une fois les molécules détectées, la microglie initie et régule la réaction inflammatoire afin de préserver l'intégrité du tissu nerveux. La microglie réagit à toute perturbation de l'homéostasie du SNC, qu'il s'agisse d'un traumatisme aigu, du vieillissement normal ou de multiples maladies neurodégénératives. Une lésion du système nerveux central entraîne une activation de la microglie et une infiltration des monocytes dérivés des macrophages, provoquée par une rupture de la barrière hémato-médullaire, sur le site de la lésion.

Les microglies sont plastiques et peuvent modifier leur morphologie en fonction du rôle et de la localisation qu'elles ont. Une microglie est sous forme ramifiée lorsqu'il n'y a pas de pathogènes à éliminer. Elle est alors répartie de manière homogène dans le système nerveux central et son rôle est d'identifier de potentiels pathogènes. Elle est peu mobile, mais sa

répartition dans tout le système nerveux central rend son activation facile, puisque peu importe la zone dans laquelle l'agression sera effectuée, il y aura une microglie présente pour la « repérer » (Kettenmann et al. 2011; Olah et al. 2011). La microglie peut avoir une forme amiboïde, c'est-à-dire sans ramification. Cette conformation permet une migration facilitée dans le système nerveux central pour rejoindre une potentielle zone d'infection et se déplacer rapidement vers les agents pathogènes. Même si dans cet état le rôle principal de la microglie est de migrer rapidement vers les agents pathogènes, elle est capable de phagocytose.

La microglie peut être activée par des cytokines, des facteurs apoptotiques ou nécrotiques. Lorsqu'elle est activée, la microglie modifie sa forme afin de l'adapter à la réponse à fournir. Ses ramifications deviennent plus épaisses et se raccourcissent, la cellule sécrète de nombreux facteurs de recrutement pour augmenter la réponse immunitaire mais aussi des facteurs cytotoxiques ciblant les pathogènes. La prolifération des microglies est particulièrement importante à cette étape (Olah et al. 2011).

La microglie activée peut être phagocytaire ou non phagocytaire. Le stade phagocytaire est le stade « final » de la réponse immunitaire de la microglie, elle prend une forme amiboïde et est capable, en plus de libérer des facteurs, de phagocytose. Son rôle dans cette conformation est de migrer jusqu'au site d'infection, de phagocyter les pathogènes tout en poursuivant le recrutement d'autres microglies via la sécrétion de facteurs pro- et anti-inflammatoires. Cependant, il a récemment été démontré que la modification de la morphologie ne reflète pas nécessairement la fonction de la microglie (Perry 2010; Ransohoff 2016). De plus, dans un contexte de lésion médullaire, notre équipe a démontré que les changements de morphologie sont différents rostralement et caudalement au site lésionnel. Nous avons aussi observé que la microglie présente une densité plus importante dans la phase aiguë qui suit la lésion (72 heures) qu'à des temps plus tardifs, ce qui s'apparente à une réactivité accrue au moment où l'extension lésionnelle est maximale (Noristani, Boukhaddaoui, et al. 2017).

Dans de nombreuses conditions neuropathologiques, il est admis que les microglies jouent un rôle à la fois positif et négatif sur la progression de la maladie (Kabba et al., 2017). Elles ont un effet neuroprotecteur mais également un effet délétère puisqu'elles sécrètent des facteurs neurotoxiques. Par ailleurs, les microglies sont aussi capables de communiquer avec les astrocytes afin de limiter l'inflammation provoquée par l'infection du SNC (Kettenmann et al. 2011).

Les astrocytes

Les astrocytes ont pour rôle principal le soutien et la protection des neurones. Ils contribuent au maintien de la barrière hémato-encéphalique, permettent de nourrir les neurones par absorption du glucose sanguin, maintiennent l'équilibre ionique extracellulaire et recyclent les neurotransmetteurs libérés par les neurones. Il est aussi accepté qu'ils participent à la formation d'un tissu cicatriciel après une infection ou une lésion.

En réponse à un stimulus, les astrocytes sont capables de libérer du calcium et divers neurotransmetteurs qui vont entraîner la libération d'autres neurotransmetteurs comme le GABA ou le glutamate par les neurones. Ils ont donc un rôle de médiateur important dans le système nerveux central.

En général, on distingue trois types d'astrocytes, les astrocytes fibreux, protoplasmiques et radiaires.

Les astrocytes fibreux possèdent des prolongements fins et longs sans ramifications, et sont dotés de peu d'organites. On les retrouve généralement dans la substance blanche.

Les astrocytes protoplasmiques possèdent des prolongements courts, épais et ramifiés, et sont dotés de beaucoup d'organites. On les retrouve plutôt dans la substance grise.

Les astrocytes radiaires sont majoritaires au cours du développement pendant lequel ils jouent un rôle dans le guidage de la migration des neurones. Ils sont considérés comme des précurseurs neuronaux et astrocytaires (Noctor et al. 2001).

Dans le laboratoire, nous avons démontré qu'une transdifférenciation autologue d'astrocytes matures résidents en progéniteurs neuronaux, puis en interneurons GABAergiques est induite par une lésion de la moelle épinière (Noristani et al. 2016). Il reste néanmoins à prouver que l'induction de cette transdifférenciation puisse générer des interneurons capables de former des synapses fonctionnelles dans un contexte de lésion médullaire.

Bien que l'augmentation de la réactivité astrocytaire (également appelée astrogliose) soit un signe pathologique important après une lésion du système nerveux central, son rôle précis après une lésion de la moelle épinière fait l'objet de débats. Les astrocytes activés surexpriment les facteurs de transcription qui favorisent l'inflammation et inhibent la repousse axonale ce qui est associé à une absence de récupération fonctionnelle spontanée après une lésion de la moelle épinière (Brambilla et al. 2009). Dans le même temps, les astrocytes jouent également un rôle protecteur après une lésion via la sécrétion de facteurs anti-inflammatoires (Kim et al. 2010) et

l'isolement des tissus sains (Wanner et al. 2013). Dans le laboratoire, nous avons constaté que l'astrogliose dépend à la fois du temps post-lésionnel et de la sévérité de la lésion et qu'en fonction de ces conditions (sévérité et temps post lésionnels), les astrocytes peuvent inhiber ou stimuler la réponse immunitaire (Noristani et al. 2016).

De plus, les astrocytes jouent aussi un rôle dans les procédés de myélinisation des oligodendrocytes (Baumann and Pham-Dinh 2001).

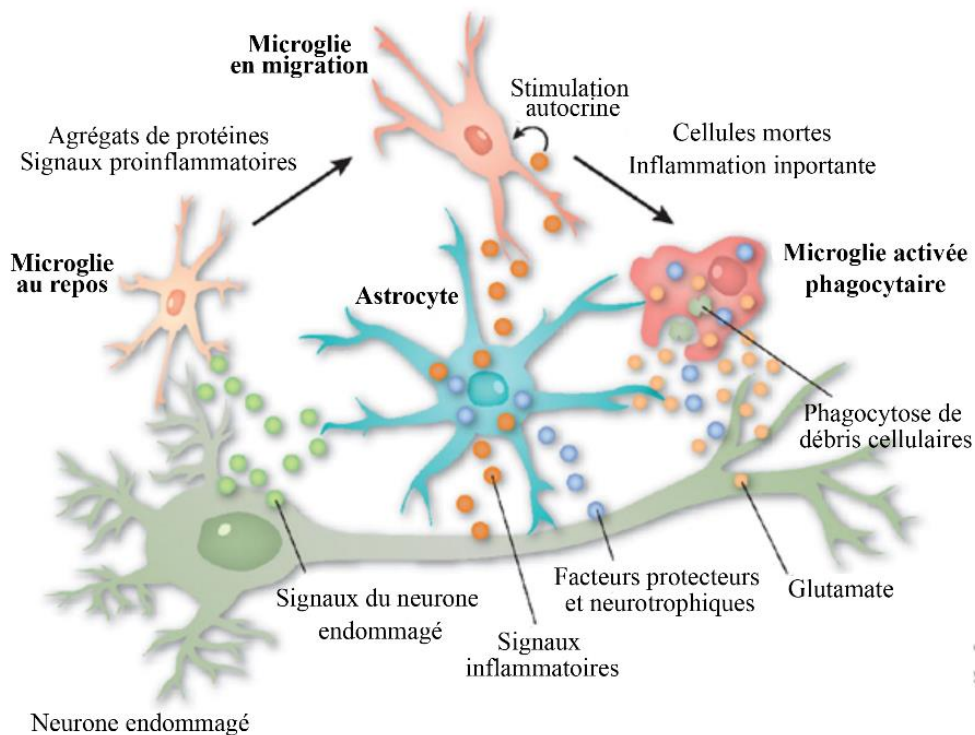


Figure 8 : Illustration de la réponse conjuguée des microglies et des astrocytes auprès d'un neurone endommagé
(Adapté de ALS: Life and death in a bad neighborhood, Monk, 2006)

Les oligodendrocytes

Dans le système nerveux central, les oligodendrocytes sont les cellules productrices de la gaine de myéline entourant les axones, permettant une propagation plus rapide de l'influx nerveux. Les cellules de Schwann ont le même rôle dans le système nerveux périphérique. Un axone myélinisé conduit l'influx nerveux par propagation saltatoire facilitée entre deux nœuds de Ranvier.

1.1.4 Le système nerveux central du petit animal

L'organisation neuroanatomique, les mécanismes physiopathologiques, les caractéristiques comportementales et donc la réponse à une lésion médullaire diffère fortement entre les murins et les primates. Contrairement aux primates, les murins ne présentent pas de relation directe entre les neurones corticospinaux et les neurones cervicaux. La plupart des fibres corticospinales chez les murins se situent dans les colonnes dorsales alors que chez les primates entre 10 et 20% des fibres se situent dans les colonnes latérales (Lemon et al. 2004). Cependant, une différence de taille entre le système nerveux central humain et celui des modèles animaux utilisés dans l'étude des lésions médullaires est aussi à prendre en compte. La différence de taille ainsi que la zone de lésion ont donc une importance lorsque l'on compare la récupération des différentes espèces après une lésion médullaire, plus particulièrement lorsque l'on compare des résultats obtenus sur des rongeurs et ceux obtenus sur des primates. L'acquisition des images IRM est par ailleurs plus complexe lorsque l'on utilise des petits animaux, puisqu'il est nécessaire d'obtenir une meilleure résolution afin d'identifier des moelles épinières bien plus petites que celle de l'Homme (1.3.8). Les différences de poids, d'anatomie et de démarche entre les modèles influent sur l'organisation du système nerveux et sur les muscles associés. De plus, certains modèles de primates sont capables de bipédie, et de ce fait, l'organisation du système nerveux central est d'autant plus proche de celui de l'humain.

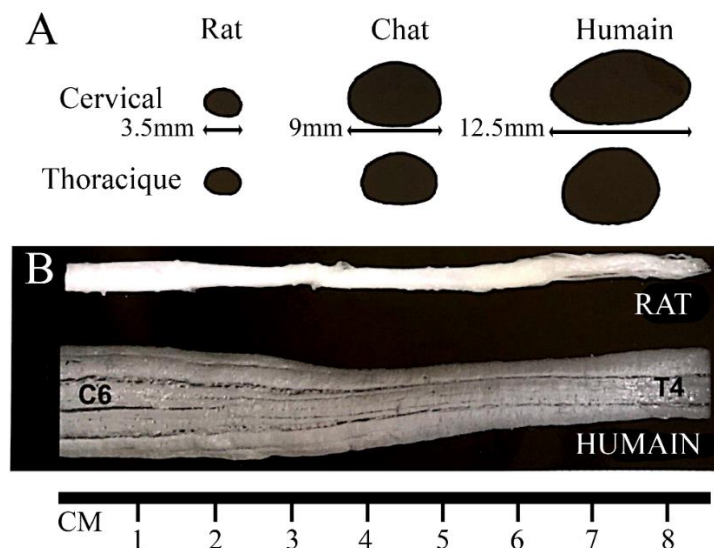


Figure sup 1: Comparaison de l'anatomie de la moelle épinière de rat, de chat et de l'Homme. (A) Représentation du diamètre de la moelle épinière de rat (3.5mm), de chat (9mm), et de l'humain (12.5mm). (B) photographie de moelle épinière de rat (en haut) et d'humain (en bas) permettant de visualiser la différence de longueur et de diamètre des deux espèces. Illustration adaptée de "The spinal cord, A Christopher and Dana Reeve foundation text and atlas, Watson C., Paxinos, G., and Kayalioglu G., 2009"

Le cortex moteur des primates et sa voie descendante, le tractus corticospinal (TCS) projette exclusivement vers le tronc cérébral et la moelle épinière. Le TCS des primates humains et non humains a subi des changements évolutifs majeurs liés au développement de capacités motrices supérieures (**Partie 1.2.4.**).

1.2 Les lésions de la moelle épinière

Les lésions de la moelle épinière peuvent causer divers degrés de dysfonction motrice et sensorielle. Les symptômes varient en fonction de la sévérité (lésion complète ou incomplète) et du niveau de la lésion (cervical, thoracique, lombaire et sacré). Toutes les fonctions dont le contrôle est localisé en dessous de la lésion étant affectées, plus la lésion est haute et complète, plus les symptômes associés seront importants. Parmi les patients survivants ayant subi une lésion de la moelle épinière, la tétraplégie incomplète (29,5%) est la plus fréquente, suivie de la paraplégie complète (27,9%), de la paraplégie incomplète (21,3%) et de la tétraplégie complète (18,5%) (“Spinal Cord Injury: Facts and Figures at a Glance” 2000).

Comme l’illustre la Figure 9, une contusion antérieure de la totalité de la moelle épinière entraîne une perte des fonctions motrices et sensorielles. Lorsque seulement la moitié de la moelle épinière est lésée, on observe une perte ipsilatérale du toucher, de la motricité et de la sensation de température. Certains patients peuvent aussi plus rarement être asymptomatiques.

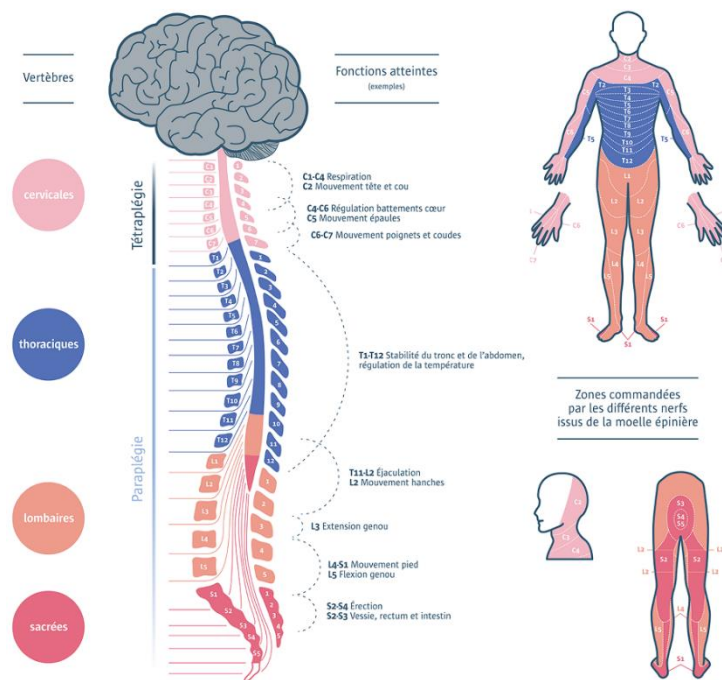


Figure 9: Illustration des différents symptômes affectant les patients souffrant d'une lésion de la moelle épinière (<http://universcience.djehouti.com>).

1.2.1 Incidence des lésions de la moelle épinière

Les lésions de la moelle épinière touchent plus de 2.5 à 4 millions de personnes dans le monde dont 40 000 en France, avec 1500 à 2000 nouveaux cas par an. Le nombre de cas par an varie en fonction des pays, on retrouve par exemple 12.1 cas par million d'habitants au Pays-Bas et 57.6 cas par million d'habitants au Portugal (van den Berg et al. 2010). La première cause de lésion de la moelle épinière est accidentelle, la plupart dans les accidents de la route, les chutes ou les accidents liés à la pratique sportive. Les personnes les plus touchées sont les jeunes, entre 15 et 29 ans, et les plus âgés, au-dessus de 65 ans. Il existe aussi des cas de lésions de la moelle épinière non traumatiques induites par une arthrose vertébrale, une compression tumorale, une ischémie vasculaire, les maladies congénitales (syringomyélie, *spina bifida*) ou les maladies inflammatoires (poliomyélite, sclérose en plaque, sclérose latérale amyotrophique). Les lésions non traumatiques représentent une proportion significative des patients (Celani et al. 2001; Ronen et al. 2004; McKinley, Seel, and Hardman 1999).

Les handicaps provoqués par les lésions de la moelle épinière induisent un important coût socio-économique dans les soins des patients. Les personnes souffrant d'une lésion de la moelle épinière ont une probabilité plus grande de décès prématuré et le taux de survie est plus faible dans les pays à revenu faible. La difficulté à mettre en place un environnement adapté rend difficile la scolarisation des étudiants lésés médullaires dans certaines régions du monde.

1.2.2 Physiopathologie

Quand le système nerveux central est lésé, une lésion primaire puis secondaire se mettent en place (Tator 1995).

a) La lésion primaire

La lésion primaire, causée par l'impact mécanique, est caractérisée par une destruction focale du tissu nerveux et la mise en place d'une zone de nécrose hémorragique. Il en résulte, des destructions vasculaires, neuronales et astrocytaires. Le choc détruit les membranes cellulaires et les vaisseaux, ce qui entraîne une ischémie et une hypoxie au niveau lésionnel.

b) La lésion secondaire

La phase secondaire correspond à une extension des processus ischémiques et hémorragiques caractérisée par une cascade d'évènements biochimiques. La lésion entraîne des phénomènes neuroinflammatoires, résultant principalement de l'activation de la microglie et d'une invasion périphérique de monocytes dérivés de macrophages, ces deux populations cellulaires sécrétant

des cytokines (David and Kroner 2011). De plus, une cicatrice gliale formée principalement d'astrocytes réactifs et de microglies réactives se met en place (Fawcett and Asher 1999). La cicatrice gliale forme une barrière physico-chimique permettant de rétablir l'homéostasie du milieu, cependant, cette cicatrice bloque la repousse axonale et participe ainsi à l'absence de régénération spontanée axonale. Néanmoins, après une lésion, les cellules gliales jouent aussi un rôle bénéfique notamment en limitant l'extension de la lésion et en synthétisant des molécules anti-inflammatoires (David and Kroner 2011).

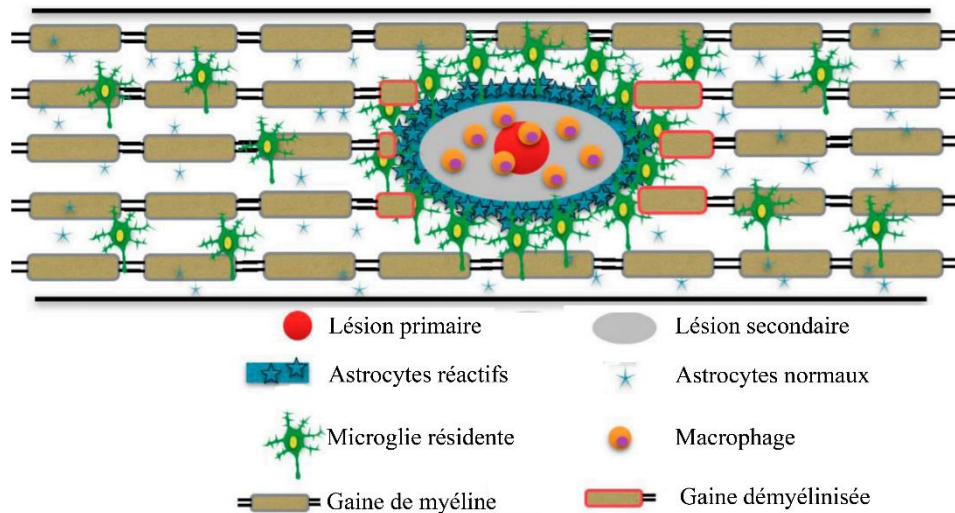


Figure 10: Illustration de la cicatrice gliale mise en place lors de la lésion secondaire de la moelle épinière (Zhou, 2014).

c) La phase aigüe

De nombreux mécanismes moléculaires sont mis en place, des radicaux libres et des acides gras sont synthétisés, les concentrations ioniques sont modifiées et des phénomènes d'excitotoxicité sont observés. Les caractères principaux de cette phase sont les phénomènes d'apoptose et de nécrose qui touchent les cellules gliales et les neurones.

d) La phase subaigüe

Cette phase survenant après la nécrose hémorragique est essentiellement marquée par une réactivité cellulaire au sein du système nerveux central, ainsi que par le recrutement de différentes populations de cellules périphériques sur le site lésionnel. Les principaux événements sont une réponse immunitaire et un phénomène de réactivité gliale entraînant des processus inflammatoires. Dans cette phase, les microglies sont recrutées au niveau lésionnel où elles prolifèrent ensuite en réponse aux molécules libérées par les cellules lésées.

e) La phase chronique

La démyélinisation ou les phénomènes de remyélinisation anormaux, contribuent de manière importante aux déficits comportementaux (Cesaro, Degos, and Martin-Mondière 1984; Nikulina et al. 1995). La démyélinisation débute 24 heures après la lésion, se poursuit et s'amplifie dans les 2 semaines qui suivent l'impact initial, et peut perdurer plusieurs mois. La mort des oligodendrocytes, directe ou progressive, joue un rôle majeur dans ce processus (Liu et al. 1997; McDonald and Belegu 2006). Cette mort oligodendrocytaire n'est pas restreinte à la seule substance blanche atteinte par les lésions primaire et secondaire, mais peut atteindre des régions de la substance blanche distantes du site lésionnel, dans lesquelles elle accompagne la dégénérescence Wallérienne des axones (Emery et al. 1998; Casha, Yu, and Fehlings 2001).

1.2.3 Déplétion transitoire de la microglie

Les neurones ont une capacité intrinsèque de repousse suite à une LME mais celle-ci n'est pas spontanée (David and Aguayo 1981). Après une lésion, les astrocytes et microglies forment une cicatrice gliale, empêchant les axones de repousser. La LME déclenche une réponse inflammatoire importante qui comprend l'activation rapide, la prolifération et la migration de la microglie vers le site de lésion ainsi que le recrutement et l'infiltration de monocytes dérivés de macrophages périphériques vers le site de la lésion (David and Kroner 2011). Suite à une lésion médullaire, les microglies jouent à la fois un rôle préjudiciable et bénéfique en contribuant, d'une part, aux lésions secondaires après la lésion médullaire et, d'autre part, à leur implication dans la neuroprotection (David, 2011). Spécifiquement, les microglies activées libèrent plusieurs médiateurs pro-inflammatoires qui participent à la mise en place de processus neuroinflammatoires et à l'expansion de la lésion. De plus, l'activation de la microglie participe au développement de douleurs neuropathiques après une LME (Walters 2014). Bien que la neuroinflammation après lésion médullaire soit généralement considérée comme préjudiciable à la régénération axonale, plusieurs études démontrent clairement le rôle bénéfique des macrophages dans l'élimination des débris du système nerveux central (Perrin et al. 2005), la régénération axonale et la remyélinisation ainsi que l'expression de facteurs neurotrophiques (Noristani, Gerber, et al. 2017). De même, d'autres études rapportent un rôle anti-inflammatoire des monocytes dérivés des macrophages médiés par la surexpression d'interleukines, après une LME (Popovich et al. 1999). Cibler les principales cellules de la neuroinflammation (microglie/macrophage, lymphocyte ou neutrophile) améliore la récupération neurologique après une LME (Samuel David, 2012). Cependant, les rôles spécifiques liés à la prolifération de la microglie dans la physiopathologie de la lésion médullaire et son association avec la

neuroinflammation, la préservation des tissus et la récupération fonctionnelle sont actuellement peu claires, nous avons donc choisi d'effectuer une déplétion transitoire et spécifique de la prolifération de la microglie.

Les microglies possèdent un récepteur membranaire au « colony-stimulating factor 1 » (CSF1R) et ce récepteur est impliqué dans la prolifération, la différenciation et la survie des cellules de lignées myéloïdes. Le GW2580 a donc une action inhibitrice de la prolifération des cellules issues de la lignée myéloïdes (monocytes, macrophages et microglie) en agissant comme un antagoniste des récepteurs au CSF1. Il bloque l'activité tyrosine kinase du récepteur liée à la prolifération cellulaire (Conway et al. 2005). Différentes études mettent en évidence qu'une inhibition spécifique de CSF1R via le GW2580, améliore les symptômes dans plusieurs maladies neurodégénératives présentant une activation des cellules de la microglie comme les maladies à prions (Gómez-Nicola et al. 2013), la maladie d'Alzheimer (Olmos-Alonso et al. 2016) et la sclérose latérale amyotrophique (Martínez-Muriana et al. 2016). Le blocage de la prolifération des microglies permettrait ainsi de moduler la cicatrice gliale en limitant le nombre de microglies au niveau du site lésionnel.

1.2.4 Modèles expérimentaux de lésion médullaire

L'objectif d'un modèle expérimental est de reproduire les symptômes de la pathologie étudiée, cependant, dans de nombreux cas, les modèles expérimentaux de lésion de la moelle épinière s'éloignent du contexte clinique. Ainsi, un modèle par contusion ou compression présentera de fortes homologues avec la clinique et permettra une analyse des mécanismes physiopathologiques suivant une LME. Un modèle induisant une lésion complète et franche représentera une partie plus faible des traumatismes humains puisque les lésions par armes blanches et par balles sont plus rares, mais permettra néanmoins une compréhension très poussée en termes de mécanismes physiopathologiques. Les lésions chez l'Homme étant très variables, il est nécessaire de mettre au point une variété de modèles lésionnels capable de les reproduire le plus fidèlement possible. Le choix du modèle lésionnel est fondamental, et il est impossible de comparer directement des résultats expérimentaux, comme la récupération fonctionnelle, entre deux études n'utilisant pas le même modèle lésionnel puisqu'il a été prouvé que les résultats ne sont pas les mêmes selon le modèle lésionnel choisi (Basso et al. 2006).

a) Compression

La première méthode pour effectuer une lésion par compression est d'introduire un ballon gonflable dans l'espace sous-dural et de le gonfler à l'intérieur du canal vertébral. Le traumatisme généré est plus ou moins important en faisant varier la durée et le volume de gonflage. Les conséquences comportementales et physiopathologiques variant en fonction du niveau de sévérité choisi. En effet, plus le volume de compression sera grand et plus la compression sera maintenue pendant une durée importante, plus les symptômes seront sévères. Des paramètres faisant varier l'intensité de la compression générant des déficits définitifs ou transitoires ont été définis et permettent donc de choisir les paramètres en fonction des déficits que l'on souhaite obtenir pour le modèle (Martin et al. 1992; Vanický et al. 2001; Lonjon et al. 2009). Le modèle de compression avec ballon simule une compression de la moelle épinière humaine causée par une dislocation qui n'est pas réduite ou une dislocation par fracture de la colonne vertébrale. Il est reconnu que les facteurs mécaniques et vasculaires de la pathogénèse de la lésion de la moelle épinière opèrent dans ce cas.

La deuxième méthode est la compression par clip. La moelle est comprimée par un clip vasculaire pendant un temps variable, allant de quelques secondes à plusieurs minutes (Rivlin and Tator 1978). La sévérité de lésion dépend du réglage de la force et de la durée de fermeture du clip. Le fait de pouvoir choisir une force (poids exercé en gramme) et une durée rend la méthode reproductible. Ce modèle fournit une information sur l'influence de la durée de compression dans la récupération. En utilisant les lésions par compression, la mortalité des animaux est relativement faible. Cette technique permet d'imiter les lésions de la moelle épinière chez l'Homme avec un stimulus traumatique quantifiable et modulable qui peut être corrélé avec la récupération fonctionnelle et le degré d'altération tissulaire de la moelle épinière.

La principale limitation de la technique réside dans le fait que la force exercée sur la moelle épinière ne reflète pas la véritable intensité d'une lésion chez l'humain, qui va dépendre de la cause de la lésion. On peut aussi imaginer que lorsque l'on gonfle le ballon, ou que l'on ferme le clip, la pression initiale effective engendrée et la déformation initiale de la moelle épinière sont difficiles à contrôler.

b) Contusion

Le modèle de lésion de la moelle épinière par contusion permet de produire une blessure dont les paramètres sont contrôlés. En effet, pour générer la blessure, un poids est lâché sur la moelle

épineière exposée. Les animaux sont soumis à une lésion dont on peut contrôler la sévérité en faisant varier l'amplitude du lâcher du poids et donc la force d'impact la surface durale, force d'impact qui est mesurée grâce un appareil électromagnétique dédié. On peut ainsi contrôler le poids lâché sur la moelle épinière, générant ainsi une lésion reproductible entre les individus (Jakeman et al. 2000). La capacité de contrôler directement la dynamique biomécanique de l'impact est importante pour évaluer les variations au moment de la blessure. En outre, ces mesures sont donc des prédicteurs sensibles des résultats comportementaux aigus et chroniques.

Une alternative au lâcher de poids consiste en l'utilisation d'une sonde d'impact électromécanique contrôlée par ordinateur.

Ohio State University Impactor (OSU):

Utilisé pour améliorer la reproductibilité de la lésion, ce modèle utilise une sonde positionnée dans un premier temps au contact de la moelle épinière exposée, avant d'impacter rapidement la moelle épinière et la déplacer d'une distance prédéterminée. Les transducteurs mesurent ensuite la force d'impact et la quantité de déplacement de la moelle épinière.

Infinite Horizon Impactor (IH) :

Ce second appareil produit une contusion de la moelle épinière fiable en appliquant rapidement un impact dont la force est prédéfinie avec un impacteur cylindrique en acier inoxydable. Un capteur de force présent sur l'embout de l'impacteur mesure la force appliquée par l'appareil sur la moelle épinière, et une fois que la force prédéfinie par l'utilisateur est atteinte, l'embout est immédiatement retiré. Les logiciels couplés à l'appareil permettent de connaître la force appliquée, le déplacement de la moelle épinière et la vitesse de l'impacteur au moment du contact maximum.

La principale limitation du modèle est qu'au niveau histologique le site de la lésion par contusion chez la souris est caractérisé par l'accumulation de tissu cicatriciel fibreux et ne correspond donc pas aux cavitations que l'on retrouve habituellement après une lésion traumatique dans la plupart des autres espèces de mammifères. Il existe plusieurs études qui visent à limiter la variabilité du modèle par impaction. Par exemple, une équipe a filmé avec une caméra grande vitesse l'impact effectué sur la moelle épinière. Dans ce cas, c'est la durée de contact entre l'impacteur et la moelle épinière qui est mesurée, permettant de vérifier si la durée renseignée par l'appareil impacteur est identique au temps réel, ce qui se n'avère ne pas être le cas dans cette étude (Fournely et al. 2018). Le temps d'application de la compression sur

la moelle épinière était sous-estimé, ce qui prouve la nécessité de normaliser la procédure afin d'uniformiser les résultats obtenus avec ce modèle lésionnel.

c) Sections : hémisection et transection

Dans ce modèle, la LME est créée par une incision dans la moelle épinière. La section de la moelle épinière s'effectue après une laminectomie avec un microscalpel chirurgical qui permet l'interruption ciblée d'un système particulier de fibres nerveuses telles que les voies motrices (tractus cortico-spinal) ou les tronçons sensoriels (colonnes dorsales) ou même une interruption complète des voies de la moelle épinière (transection). Pour évaluer les stratégies qui ciblent la régénération de l'axone, les modèles de sections partielles ou complètes sont en général favorisés. Il existe aussi des modèles lésionnels dans lesquels une petite portion de la moelle épinière peut être retirée, ceci permettant d'implanter un dispositif spécifique (Bunge 1994; X. M. Xu et al. 1995, 1999). Les modèles de transection sont de bonnes stratégies d'évaluation initiale qui visent la régénération axonale. Les inconvénients majeurs des modèles de transection sont que de telles blessures se rencontrent rarement en Europe dans un contexte clinique puisque plutôt provoquées par des armes à feu ou des armes blanches. De plus, les animaux nécessitent des soins postopératoires importants.

Pour certaines applications, la section partielle est une bonne alternative à la transection. En effet, la lésion qui résulte d'une transection crée un environnement de tissu hostile. Lorsque la section est partielle, les cavitations sont moins importantes, la régénération de certains axones est possible, on parle du phénomène de bourgeonnement des axones. Il est par ailleurs possible de discriminer les axones régénérés des axones épargnés par l'hémisection initiale (Steward, Zheng, and Tessier-Lavigne 2003). Les hémisections latérales lèsent tous les tractus d'un côté, mais épargnent toutes les parties du côté opposé. Un avantage majeur de cette approche est l'intégrité et la fonction structurelle préservées d'un côté de la moelle épinière. Le fait de préserver un côté de la moelle épinière est généralement suffisant pour maintenir les fonctions des sphincters vésicaux et intestinaux, ce qui entraîne des risques d'infection et des soins postopératoires moins importants. De plus, les tissus préservés sont le siège de potentiels phénomènes de plasticité. L'hémisection latérale est le modèle lésionnel choisi pour le sujet de thèse, la chirurgie étant reproductible inter-opérateurs, permettant de comparer les animaux et leur récupération au cours du temps.

d) Modèles murins

La possibilité d'utiliser différentes souches de souris transgéniques ou non est particulièrement utile pour l'étude des mécanismes physiopathologiques impliqués dans les lésions de la moelle épinière. En effet, les différences inhérentes à la souche, voire même la différence de fournisseur (Lonjon et al. 2009), jouent un rôle important dans la capacité de récupération fonctionnelle après une lésion. Par exemple, même s'il n'a jamais été prouvé qu'elle a un impact direct sur la régénération, l'activation des macrophages est différente entre deux souches, alors que le volume lésionnel entre les souches est identique (Kigerl, McGaughy, and Popovich 2006).

Il existe dans la littérature une multitude de souches de souris disponibles. La souche de souris C57BL/6 n'est pas décrite comme la souris qui récupère le mieux spontanément après une lésion de la moelle épinière, par rapport aux souris C57BL/10, B10.PL ou C57BL/6x12956 F1 qui récupèrent très bien (Basso et al. 2006). De plus, la même mutation génétique n'aura pas le même effet sur des souris ayant un fond génétique différent. Par exemple, 3 souris Nogo « knock-out » avec un fond génétique différent présentent une régénération cortico-spinale différente (Kim et al. 2003; Simonen et al. 2003; Zheng et al. 2003).

Nous avons utilisé des souris transgéniques exprimant la « enhanced green fluorescence protein » (eGFP) soit dans les astrocytes (Aldh1l1-EGFP) soit dans les microglies et monocytes (CX3CR1^{+GFP}). Les souris Aldh1l1-EGFP sont maintenues sous un fond génétique Swiss Webster alors que les CX3CR1^{+GFP} sont sous un fond C57BL/6. L'utilisation de souris exprimant l'eGFP ne se justifie pas en IRM mais elle permet de faciliter l'utilisation des tissus en histopathologie et donne la possibilité d'effectuer un tri cellulaire en utilisant le fluorescence-activated cell sorting (FACS) qui permet de purifier un type cellulaire pour ensuite faire du séquençage par exemple.

e) Modèles primates

Les principaux échecs dans la translation à la clinique proviennent de multiples facteurs comme les différences entre les espèces, le développement de modèles animaux modérément prédictifs, et les différences dans les méthodologies entre les études précliniques et cliniques. Il existe des différences significatives dans l'organisation neuroanatomique des systèmes moteurs et sensoriels, ainsi que des variations neurophysiologiques entre les rongeurs et les primates (Courtine et al. 2007), qui peuvent expliquer pourquoi les réponses après une lésion médullaire varient considérablement entre les espèces (Friedli et al. 2015).

La principale variation neuroanatomique réside dans le cortex moteur et sa voie descendante, le tractus cortico-spinal (TCS), qui projette vers le tronc cérébral et la moelle épinière. Chez plusieurs primates, le TCS peut influencer l'activité des motoneurones directement et indirectement (Lemon et al. 2004). Les différences entre les rongeurs et les primates dans la structure des terminaisons du TCS sont multiples. Chez les rongeurs, le TCS se projette principalement sur les neurones de la corne dorsale et aux circuits spinaux pré moteurs. Chez de nombreux primates non-humains, comme le singe macaque rhésus, les projections du TCS est beaucoup plus complexe: une proportion significative de fibres du tractus projetant sur la corne ventrale et certains axones forment une synapse directe sur les motoneurones, en particulier ceux innervant les muscles des mains (Fig. 11).

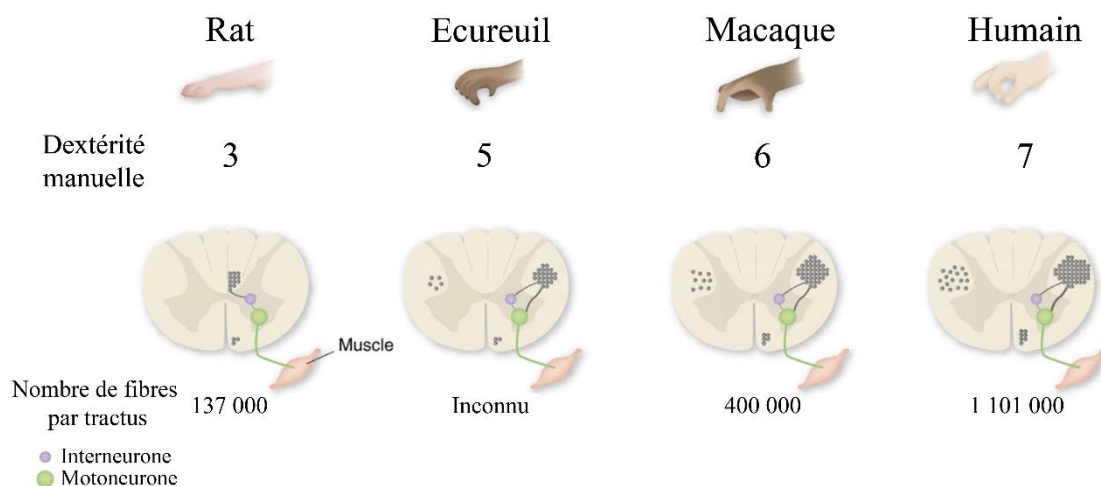


Figure 11 : Illustration adaptée (Courtine, 2007) montrant une corrélation entre le développement du tractus cortico-spinal et la dextérité manuelle, notée de 1 à 7 (Heffner, 1975). La plupart des fibres du TCS chez les rongeurs se situent dans les colonnes dorsales. En revanche, le TCS des primates se projette principalement sur les colonnes latérales, et une proportion significative de fibres corticospinales (10-20%) descendent ipsilatéralement.

En effet, l'architecture spécifique du tractus cortico-spinal chez les primates pourrait expliquer leur récupération fonctionnelle supérieure après lésions latéralisées au niveau cervical par rapport aux rongeurs (Friedli et al. 2015). Les récupérations fonctionnelles spontanées observées précocement après une lésion chez l'homme avec des lésions partielles de la moelle épinière pourraient aussi être un indice de la capacité de récupération supérieure des primates (Curt et al. 2008). Bien que les rongeurs restent essentiels pour faire progresser les connaissances sur la physiopathologie des lésions médullaires, la réponse unique du tractus

cortico-spinal des primates après une lésion de la moelle épinière souligne l'importance des modèles de primates pour la conception de stratégies thérapeutiques transposable à la clinique.

Ces éléments soulignent la nécessité de mettre au point des modèles de lésion médullaire chez le primate non-humain qui seraient probablement bien plus prédictifs que les modèles murins et susceptibles de permettre une transition vers la recherche translationnelle (Nardone et al. 2017).

1.3 L'imagerie par résonance magnétique

Les informations et illustrations relatives à cette partie sont inspirées en partie du livre « Magnetic Resonance Imaging » de Robert W. Brown et al. et de « Spin Dynamics » de Malcolm H. Levitt. Toutes les illustrations ont été personnalisées.

1.3.1 Le magnétisme

Les aimants ont une propriété particulière, ils ont deux pôles : un pôle nord négatif et un pôle sud positif. Les pôles de signe inverse s'attirent et ceux de même signe se repoussent. Autour des pôles des aimants existe un champ magnétique.

Pour pouvoir être utilisés en résonance magnétique, les aimants doivent produire un champ magnétique puissant et uniforme. Le champ magnétique de la Terre est de 5×10^{-5} Tesla alors que l'aimant que nous utilisons produit un champ de 9.4 Tesla, soit 200 000 fois plus puissant. Les champs magnétiques sont sensiblement liés au courant électrique. En effet, lorsque le courant électrique est produit par des charges électriques en mouvement, il crée un champ magnétique.

Un champ magnétique est représenté par un vecteur (Fig. 12). Ainsi, le champ magnétique principal en IRM est fixe et est représenté par la lettre $\vec{B_0}$.

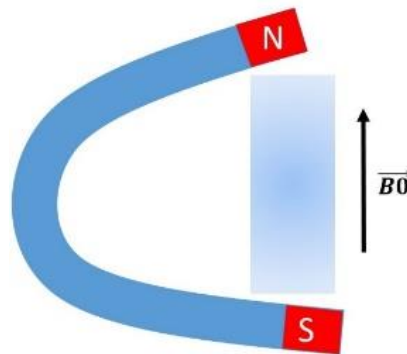


Figure 12 : le vecteur $\vec{B_0}$ possède une direction et un sens mais aussi un point d'application et une norme (qui correspond à son intensité).

1.3.2 Interaction du proton avec le champ magnétique

L'IRM est basée sur l'interaction entre le noyau d'un atome et un champ magnétique externe \vec{B}_0 . Certains noyaux possèdent un moment magnétique que l'on appelle spin nucléaire. On dit aussi par extension qu'ils ont un spin.

On représente le spin par une flèche sur le proton et par la lettre $\vec{\mu}$:

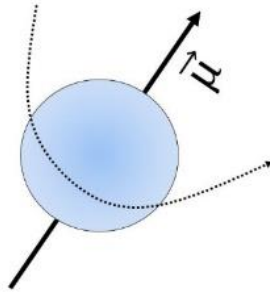


Figure 13 : Spin du proton

Lorsque le groupe de protons est soumis à un champ magnétique, ils vont s'aligner dans la direction du champ, soit en position parallèle soit en position antiparallèle. Plus exactement, ils ne vont pas s'aligner parfaitement dans l'axe. Ils vont tourner autour de cet axe à grande vitesse. Ce mouvement s'appelle la précession.

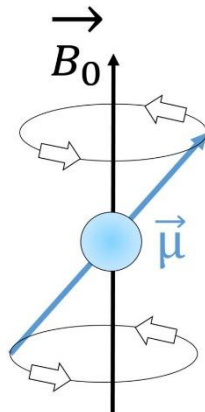


Figure 14 : La précession correspond au déplacement circulaire de l'axe de rotation d'un corps tournant par rapport à un axe fixe.

Le principe de résonance magnétique nucléaire repose donc sur la capacité de manipuler un ensemble de champ magnétique pour détecter l'ensemble des précessions des spins d'hydrogène présents dans l'échantillon étudié.

En IRM, le signal provient la plupart du temps du proton de l'hydrogène, massivement présent dans le corps sous la forme d'eau (H₂O). On peut aussi observer d'autres noyaux comme le phosphore ou le sodium.

En résumé, le noyau de l'hydrogène possède un moment magnétique non nul lorsqu'il est soumis à un champ magnétique. Lorsqu'il est placé dans le champ magnétique, le spin va s'aligner, soit en position parallèle (du sud au nord), soit en position antiparallèle (du nord au sud).

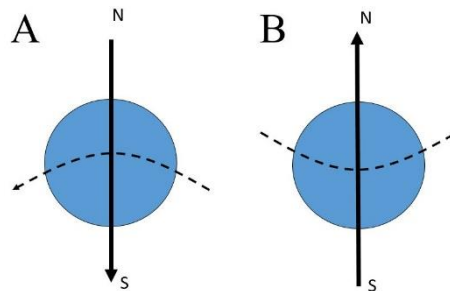


Figure 15 : Spin en position antiparallèle (A) et en position parallèle (B)

Les positions sont différentes dans le sens où elles correspondent à des niveaux d'énergie différents. En effet, il faut moins d'énergie pour mettre un proton en position parallèle. Ainsi, il y a plus de protons alignés dans le sens du champ magnétique (parallèle) puisqu'elle nécessite moins d'énergie. La distribution de Boltzmann définit la différence entre nombre de protons en position parallèle et en position antiparallèle en fonction de la température, quel que soit le champ.

Entre la position parallèle et antiparallèle, il existe une différence d'énergie ΔE . C'est cette différence ΔE entre les deux niveaux d'énergie qui va rendre possible la détection d'un signal de résonance magnétique.

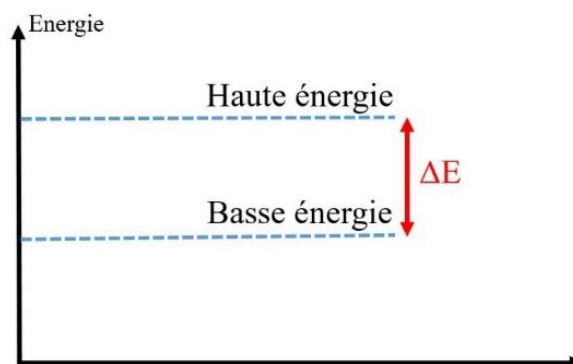


Figure 16 : La différence d'énergie ΔE permet la détection d'un signal.

Lorsque l'on augmente l'intensité du champ magnétique, on augmente aussi la différence entre les deux états de spin. On augmente donc le signal reçu.

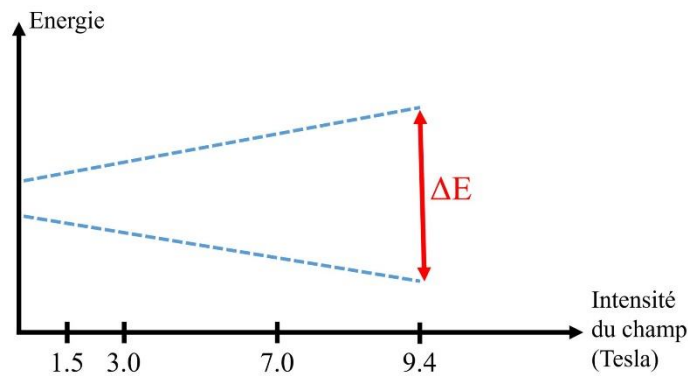


Figure 17 : La différence d'énergie ΔE augmente lorsque l'intensité du champ magnétique augmente.

Les protons vont rapidement atteindre un état d'équilibre lorsqu'ils sont placés dans un champ magnétique et seront soumis à l'influence de la température extérieure. La température entraîne en effet le passage d'un état d'énergie à l'autre, mais l'équilibre global est conservé.

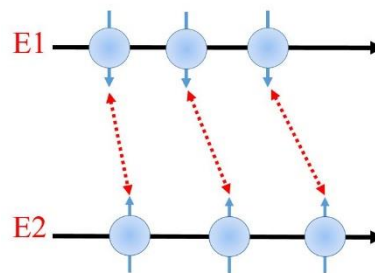


Figure 18 : Le nombre d'échanges entre les états E1 et E2 dépend de la température. C'est l'état d'équilibre thermique.

Lorsque l'on apporte au système la quantité d'énergie ΔE , le nombre de passages entre les deux états d'énergie va augmenter. C'est ce que l'onde radiofréquence fait en IRM.

1.3.3 Résonance magnétique nucléaire (RMN)

Le phénomène de résonance met en évidence la sensibilité de certains systèmes physiques à certaines fréquences. C'est une onde, un phénomène vibratoire, qui va déclencher la résonance ou non en fonction de son amplitude et de sa fréquence.

Lorsque l'objet est mis en présence d'une onde dont la fréquence correspond à sa propre fréquence (que l'on appelle la fréquence de Larmor), il entre en mouvement, l'amplitude de

celui-ci augmente et il entre en résonance. La résonance est le transfert d'énergie entre deux systèmes oscillant à la même fréquence.

Pour en revenir à l'IRM, l'onde « déclenchante » sera une onde électromagnétique, de l'ordre du Mégahertz (10^6 Hz). En imagerie par résonance magnétique, on utilise des ondes appelées radiofréquences (symbole RF). L'émission RF se fait par une bobine, que l'on appellera antenne, dans laquelle des dispositifs électroniques provoquent des oscillations électriques. La réception RF se fait également par une antenne. On dit donc que les antennes sont émettrices et réceptrices. Comme précédemment expliqué, pour résonner, l'antenne doit contenir un objet résonant à la même fréquence qu'elle. Si on place un objet sur le chemin d'une onde RF, il ne se produira rien. En effet, naturellement l'objet ne résonne pas à la même fréquence que l'antenne. Pour recueillir un signal en provenance de l'objet, il faut d'abord mettre la moelle épinière en état de réagir à l'onde RF. Pour cela, on place l'objet dans un champ magnétique.

Un signal n'est toutefois pas obtenu pour toutes les fréquences, il faut la choisir très précisément car elle va dépendre :

- de la nature des structures de l'objet qui vont réagir à l'onde RF
- de l'intensité du champ magnétique

La structure qui va réagir dans la moelle épinière est le noyau des atomes, et chaque noyau (d'hydrogène dans notre cas) placé dans le même champ magnétique résonne à sa fréquence propre ν . Cette fréquence varie avec l'intensité du champ magnétique.

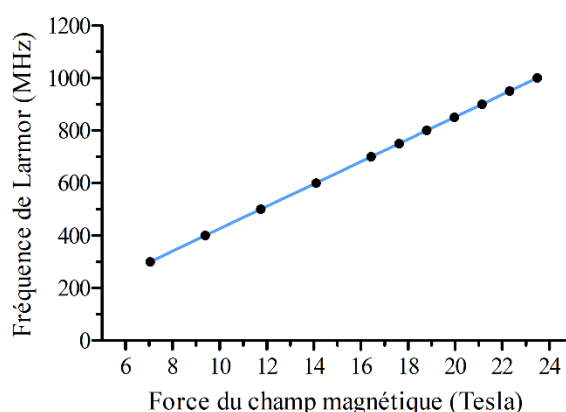


Figure 19 : Fréquence de résonance du proton de l'hydrogène en fonction de l'intensité du champ magnétique.

Par exemple, l'hydrogène résonne à 63.9MHz à 1.5T et à 400MHz à 9.4T. Les protons rentrent en résonance lorsqu'ils sont excités par une onde RF de longueur d'onde appropriée. Pour faire

basculer un proton d'un état d'énergie à l'autre, il faut lui apporter la quantité d'énergie qui est nécessaire, c'est à dire la différence ΔE entre les deux niveaux d'énergie.

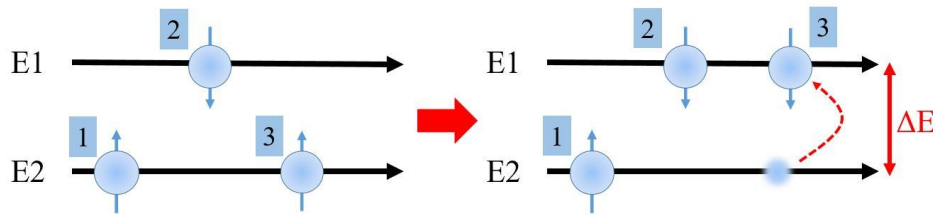


Figure 20 : Le proton numéro 3 a reçu la quantité d'énergie ΔE pour basculer de la position parallèle E2 à la position antiparallèle E1.

L'énergie ΔE dépend du noyau considéré, elle ne varie qu'avec le champ magnétique \vec{B}_0 .

$$\Delta E = \gamma B_0 \frac{h}{2\pi}$$

γ : rapport gyromagnétique caractéristique du noyau ; h : constante de Planck

La résonance se fait pour une certaine fréquence, la fréquence de Larmor, qui est caractéristique de chaque noyau. Bohr a montré que la différence entre deux niveaux d'énergie est égale à la fréquence de résonance multiplié par la constante de Planck.

Comme $\Delta E = h\nu$;

$$h\nu = \gamma B_0 \frac{h}{2\pi} \text{ donc } \nu = B_0 \frac{\gamma}{2\pi}$$

La fréquence ν ne dépend donc que du champ B_0 puisque $\frac{\gamma}{2\pi}$ est une constante. Cette dernière équation est appelée l'équation de Larmor et démontre que pour un noyau donné la fréquence de résonance est proportionnelle à l'intensité du champ magnétique.

L'énergie doit donc être apportée par une onde électromagnétique dont la fréquence correspond à la fréquence de résonance du noyau. Pour le noyau d'hydrogène, à un champ magnétique de 9.4 Tesla, cette fréquence est égale à 400 MHz.

$$\nu_{1H} = 9.4 \times \frac{267.513}{2\pi} = 400.21 \text{ MHz}$$

Pour résumer, les spins des protons sont alignés dans un champ magnétique fixe puis une onde RF de fréquence caractéristique est appliquée sur l'objet. Cela entraîne la résonance des noyaux et l'énergie que les protons absorbent en passant de l'état fondamental de basse énergie E2 à l'état excité de haute énergie E1 va être restituée lorsqu'ils vont basculer dans le sens inverse.

Une partie de l'énergie envoyée est dissipée sous forme de chaleur dans le milieu extérieur mais une faible partie va générer une onde RF de même fréquence que l'onde originale. C'est cette onde qui va être recueillie par la partie réceptrice de l'antenne après la fin de l'émission de l'onde RF originale. Ce signal recueilli va décroître rapidement en fonction du temps, il est généralement représenté par une sinusoïde amortie.

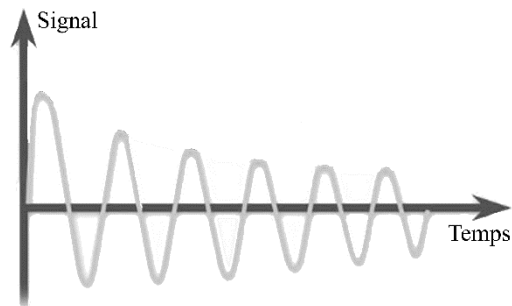


Figure 21 : Le signal recueilli va décroître au cours du temps pour former une sinusoïde amortie.

Cette sinusoïde est caractérisée par trois paramètres :

- sa fréquence, qui correspond à la fréquence de résonance
- son amplitude de départ, qui dépend du nombre de protons dans l'échantillon, de l'intensité de l'onde RF, de l'intensité du champ magnétique et de l'environnement physicochimique des protons (l'amplitude correspond à l'intensité du courant induite par l'onde RF dans la bobine réceptrice)
- l'exponentielle décroissante de sa courbe de décroissance libre

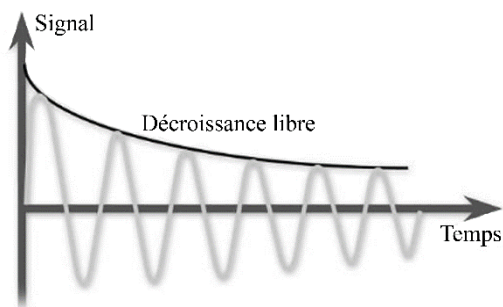


Figure 22 : La décroissance est dite libre car elle s'effectue librement après l'arrêt de l'impulsion RF.

L'impulsion RF a induit le signal d'où le nom de « décroissance de l'induction libre » ou en anglais « free induction decay » (FID). La courbe est très généralement appelée FID.

Après l'excitation des noyaux alignés dans un champ magnétique par une onde RF de fréquence caractéristique, on recueille un signal qui est caractérisé par une courbe FID. Ce signal émis par les protons et collecté par l'antenne radiofréquence après excitation ne pourra permettre

l'obtention d'une image que si des gradients de lecture et de phase ont été appliqués de manière à coder spatialement l'information.

Le mouvement de précession se fait à la même fréquence que la résonance, c'est-à-dire à la fréquence de Larmor. La figure précédente représente un seul proton mais tous les protons précessent à la même fréquence mais indépendamment, ils n'ont pas la même phase. On dit qu'ils sont déphasés les uns par rapport aux autres.

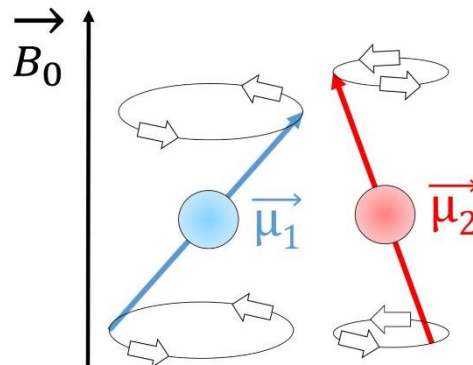


Figure 23 : Les protons précessent à la même fréquence de manière indépendante autour de l'axe B_0 , ils sont déphasés.

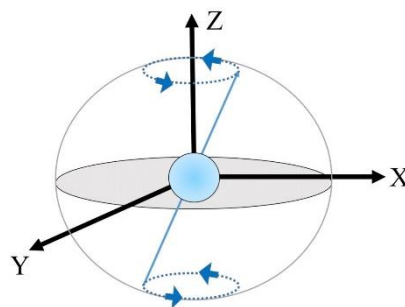


Figure 24 : Sur le globe, l'axe nord-sud est l'axe Z, le plan de l'équateur est représenté par les axes X-Y.

A l'équilibre, on peut assigner une valeur au vecteur représentant la somme des spins des protons en position parallèle au champ \vec{B}_0 . Cette valeur est appelée vecteur d'aimantation \vec{M} . Les vecteurs sont dits « aimantés » lorsqu'ils sont dans cette position d'équilibre.

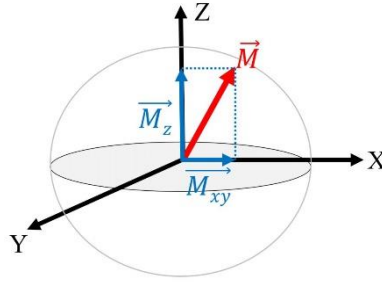


Figure 25 : Le vecteur d'aimantation \vec{M} a deux composantes : l'une sur l'axe Z, l'autre sur le plan XY.

La composante sur l'axe Z est appelée vecteur d'aimantation longitudinale \vec{M}_z et il est maximum à l'état d'équilibre. La composante sur le plan XY est appelée vecteur d'aimantation transversale \vec{M}_{xy} et il est pratiquement nul à l'état d'équilibre puisque les protons sont déphasés et leur somme s'annule. Lorsque l'onde RF excite les spins des protons à la fréquence de résonance, les protons vont précesser en phase. De ce fait, leur somme ne s'annule plus et on va voir apparaître un vecteur d'aimantation transversale dans le plan XY.

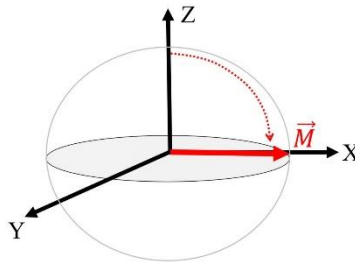


Figure 26 : Les protons précessent en phase et leur somme n'est pas nulle. Le vecteur tourne dans le plan XY à la fréquence de précession des protons.

Le vecteur d'aimantation est défini par sa projection sur l'axe Z et sur le plan XY. Pour plus de facilité, on représentera un vecteur fixe dans un plan XY tournant autour de l'axe Z à la fréquence de précession. Il faut néanmoins garder à l'esprit que le vecteur tourne lui aussi dans le repère fixe.

Prenons 3 positions P : P₀, P₁ et P₂

Le point P₀ possède une aimantation longitudinale \vec{M}_z diminuée et une aimantation transversale \vec{M}_{xy} augmentée par rapport à la position d'équilibre

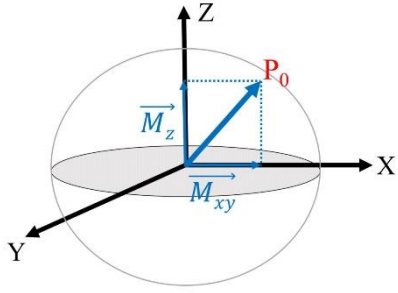


Figure 27: La position P_0 correspond à un certain temps après le début de l'impulsion RF.

A la fin de l'impulsion RF, les spins vont revenir à leur état d'équilibre, en restituant l'énergie acquise sous forme d'un signal, une onde RF de fréquence spécifique.

Dans la position P_1 , l'aimantation longitudinale \vec{M}_z est nulle et l'aimantation transversale \vec{M}_{xy} est maximale. \vec{M}_z et \vec{M}_{xy} varient en sens inverse l'un de l'autre. Pour mettre les spins dans cette position, le vecteur d'aimantation a basculé de 90° ($\Pi/2$).

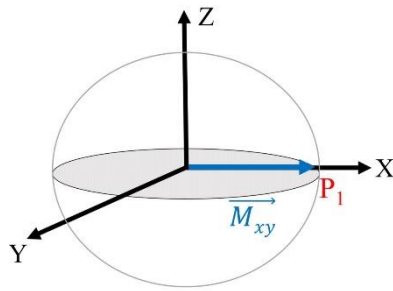


Figure 28 : La position P_1 correspond à une bascule de 90° du vecteur d'aimantation.

Dans la position P_2 , le vecteur d'aimantation \vec{M} est en position inverse, avec une composante transversale \vec{M}_{xy} nulle. Cette position est obtenue pour une bascule du vecteur d'aimantation de 180° (Π).

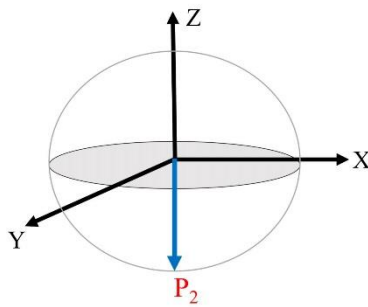


Figure 29 : La position P_2 correspond à une bascule de 180° du vecteur d'aimantation.

1.3.4 Temps de relaxation T1 et T2

Chacune des composantes de l'aimantation est caractérisée par une constante de temps : T1 pour l'aimantation longitudinale et T2 pour l'aimantation transversale. Le retour des protons à l'équilibre à la fin de l'impulsion RF s'appelle la relaxation. Il existe la relaxation longitudinale et transversale. Ces phénomènes vont mettre un certain temps à se produire, et ce sont ces temps qui vont définir les constantes de temps T1 et T2.

T1 est le temps nécessaire pour que l'aimantation longitudinale ait récupéré 63% de son aimantation.

T2 est le temps nécessaire pour que l'aimantation transversale ait perdu 63% de son aimantation.

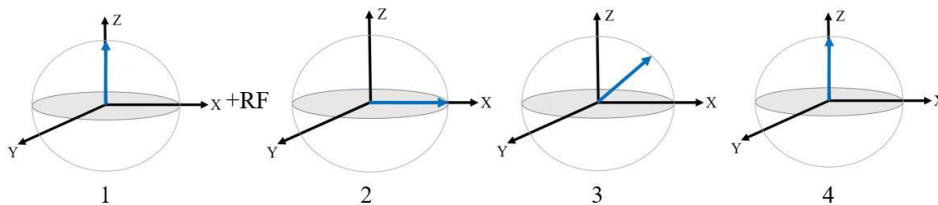


Figure 30 : 1 : position d'équilibre ; 2 : M_z diminue rapidement et devient nul pour une impulsion 90° ; 3 : M_z repousse ; 4 : M_z a récupéré son aimantation

L'aimantation longitudinale \vec{M}_z repousse en suivant une courbe exponentielle. La constante de temps de l'exponentielle T1 est associée à la vitesse de relaxation de \vec{M}_z . Cette constante est caractéristique d'un tissu donné.

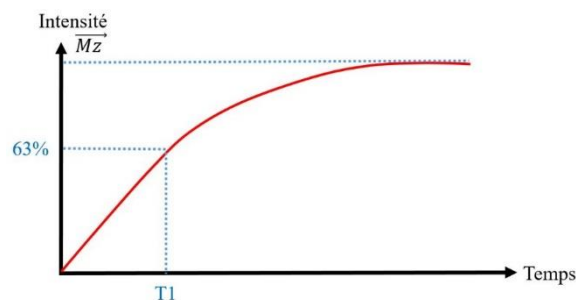


Figure 31 : Le retour à l'équilibre est très rapide au début, beaucoup plus lente ensuite. Au temps T1, 63% de l'aimantation aura repoussé.

Dans un solide, le réseau est en général très serré et les échanges d'énergie sont très rapides, tout comme la relaxation. Le T1 sera donc court car si l'énergie diminue rapidement, la composante \vec{M}_z augmente et on atteindra rapidement 63% du signal. Au contraire, dans un

liquide, le réseau est beaucoup moins serré. La perte d'énergie est moins rapide, le temps de relaxation T1 est plus long. Les temps de relaxation T1 sont de l'ordre de la seconde. Plus il y a de source de relaxation, plus la relaxation sera rapide, et plus le T1 sera court.

Lors de l'impulsion RF, les spins se mettent en phase, et cela fait apparaître une composante transversale \vec{M}_{xy} , qui sera maximale pour une impulsion $\Pi/2$. Dès la fin de l'impulsion, les spins se déphasent les uns par rapport aux autres. Certains précessent plus lentement, d'autres plus vite.

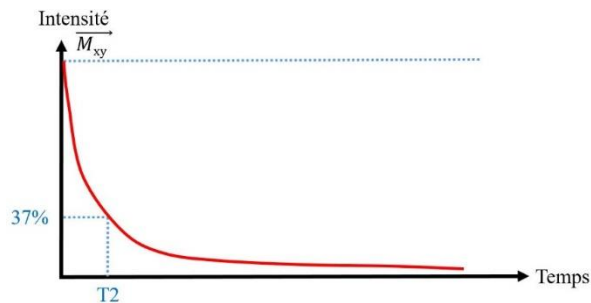


Figure 32 : Comme pour T1, la décroissance de l'aimantation transversale est rapide au début, plus lente ensuite. Au temps T2, 63% de l'aimantation aura été perdue.

T2 est toujours plus court que T1, souvent beaucoup plus court et il s'exprime en millisecondes. Les spins se déphasent à cause de leurs interactions réciproques. Il n'y a pas d'énergie échangée mais en fonction de la proximité des protons entre eux, le déphasage ne sera pas le même et la relaxation sera donc différente. Les interactions entre les spins diffèrent en fonction du tissu. Dans un liquide pur, les spins vont rester en phase plus longtemps. Le T2 des liquides est donc extrêmement long, l'intensité du signal mettra plus de temps à diminuer. Au contraire, dans un solide, les interactions sont multiples et les spins vont donc se déphaser beaucoup plus rapidement. Le T2 des solides est donc très court. Le T1 et le T2 des tissus dépendent donc de la force des interactions entre les spins.

Les effets de T1 et de T2 vont parfois s'opposer et on est parfois confronté à une perte de contraste entre les tissus. Pour pallier à ce problème, il est nécessaire de connaître les propriétés T1 et T2 des tissus afin de choisir les paramètres d'acquisitions adéquats (que nous exposerons plus loin) permettant la discrimination des différents tissus. On peut notamment répéter

l'impulsion RF, modifier le temps entre deux impulsions, et choisir le moment du recueil du signal.

Nous avons vu que le signal disparaissait très rapidement à cause du déphasage des protons. La décroissance du signal dépend aussi de l'inhomogénéité du champ magnétique. De manière générale, les champs magnétiques sont considérés comme homogènes mais on se rend compte lorsque l'on se place au niveau microscopique que ce n'est pas le cas.

Ces inhomogénéités entraînent donc une décroissance du signal. Le signal observé dépend donc du T2 du tissu observé mais il contient aussi les inhomogénéités du champ. Cette grandeur est appelée T2*.

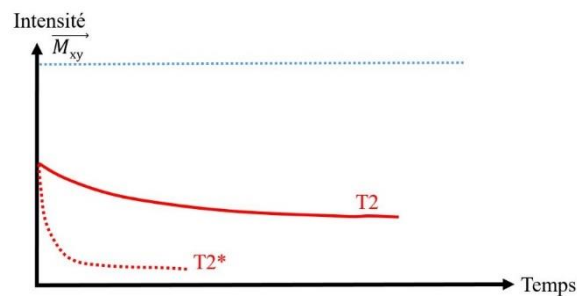


Figure 33 : Le signal observé T2* représente T2 + inhomogénéités du champ magnétique.

Pour observer le T2 réel, il faut pouvoir « éliminer » ces inhomogénéités, qui sont constantes. Si les spins sont remis en phase, on peut observer une nouvelle fois leur décroissance et ensuite soustraire du signal obtenu la constante d'inhomogénéité.

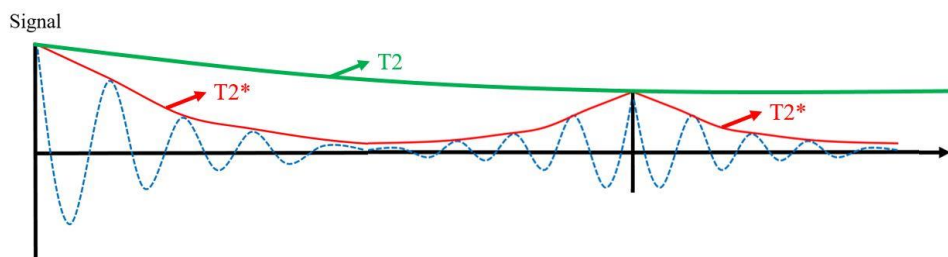


Figure 34 : En joignant entre eux les sommets de plusieurs courbes FID successives, on peut mesurer la vraie valeur de T2.

On peut remettre en phase les spins par une impulsion 180°, c'est ce que l'on appelle un écho.

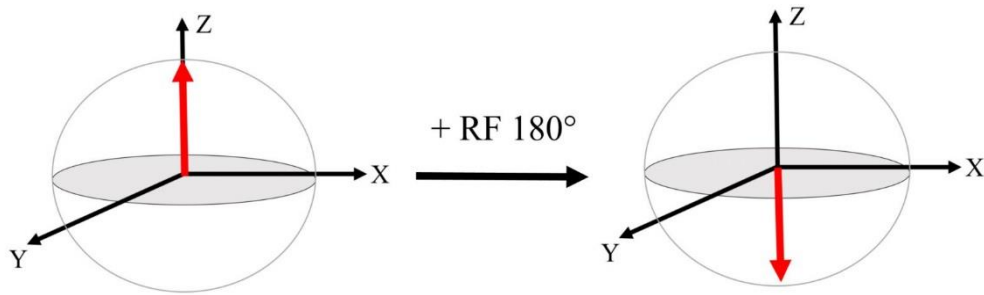


Figure 35 : Une impulsion Π est capable d'inverser l'aimantation longitudinale M_z .

Une impulsion Π va inverser ou basculer le vecteur \vec{M}_{xy} . Si cette impulsion est appliquée pendant que les spins commencent à se déphaser, on obtient une image en « miroir ».

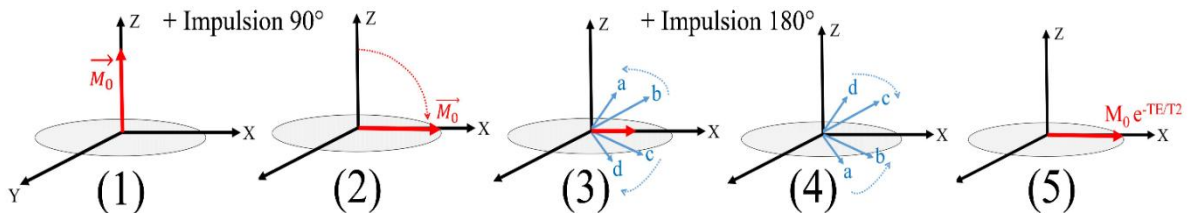


Figure 36 : Les spins qui avaient commencé à se déphaser vont refaire le chemin inverse avant de se déphaser à nouveau.

- 1 : Le vecteur \vec{M}_z est au maximum avant l'impulsion $\Pi/2$.
- 2 : Le vecteur \vec{M}_{xy} est au maximum à la fin de l'impulsion $\Pi/2$. Les spins basculent dans le plan transversal.
- 3 : Déphasage rapide des spins représenté par la courbe T_2^* (FID).
- 4 : Impulsion Π de rephasage dans le plan transversal. Les spins ont basculé de 180° et commencent à se rephaser.
- 5 : Les spins sont rephasés. Le signal peut être mesuré à nouveau, c'est l'écho des spins.

Pour aller plus loin dans la description de la dynamique des spins nucléaires, on utilise des équations de Bloch pour un spin $1/2$ comme le proton (voir Annexe 2).

1.3.5 Temps de répétition et temps d'écho

Nous avons vu dans la partie précédente que si on répète l'impulsion RF, on obtient un nouveau signal. L'intervalle de temps séparant deux impulsions RF est appelé temps de répétition (TR). Le temps de répétition a un effet sur lequel on peut jouer afin de « pondérer » les images comme on le souhaite. Si le TR est long, l'aimantation longitudinale aura quasiment complètement repoussé entre chaque impulsion de $\Pi/2$.

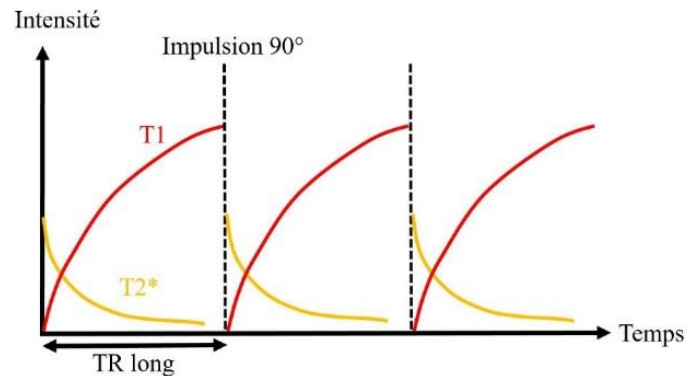


Figure 37 : Les courbes de relaxation longitudinale T_1 et de relaxation transversale T_2 sont représentées simultanément sur le schéma avec un TR long.

Avec un TR plus court, la deuxième impulsion de $\Pi/2$ coupe la ré-aimantation longitudinale avant qu'elle ne soit totale.

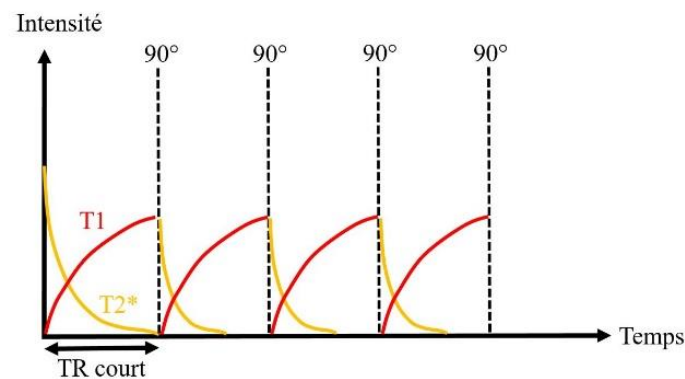


Figure 38 : L'amplitude de la courbe FID qui est de 100% pour la première impulsion est inférieure lors des suivantes puisque l'aimantation globale n'a pas récupéré sa valeur de départ.

Lorsque l'on fait varier la valeur de TR, la variation de signal qui en résulte est dépendante du temps de relaxation T_1 du tissu, TR et T_1 sont donc liés. Si deux tissus différents ont deux temps de relaxation T_1 différents, le signal sera différent en fonction du TR choisi.

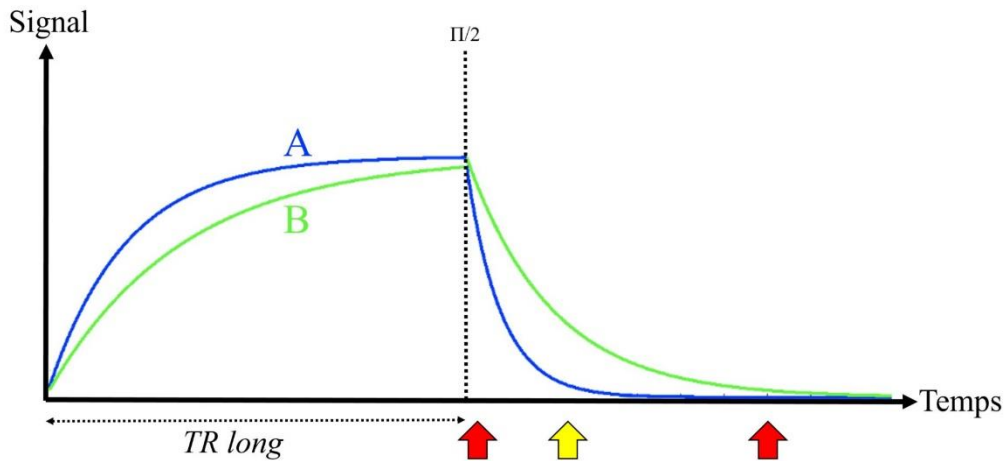


Figure 39 : Un TR long ne permettra pas de distinguer les signaux des tissus A et B si un TE très court ou très long est choisi (flèches rouges). Il existe un TE optimal pour lequel le contraste entre les tissus est maximal (flèche jaune). Le contraste entre les tissus A et B dépend du TE choisit.

Les images obtenues avec un TR long ne seront pas influencées par la propriété T1 du tissu puisque les tissus auront récupéré leur aimantation. On dit donc que les images obtenues dépendent des propriétés T2 des tissus, donc qu'elles sont pondérées T2. Le contraste optimal entre les tissus A et B dépendra donc du choix du TE. En effet, la différence de signal entre les tissus sera maximale pour un TE donné.

Au contraire, pour un TR court, le tissu A aura récupéré davantage que le tissu B et donnera donc un signal plus important lors de l'impulsion suivante.

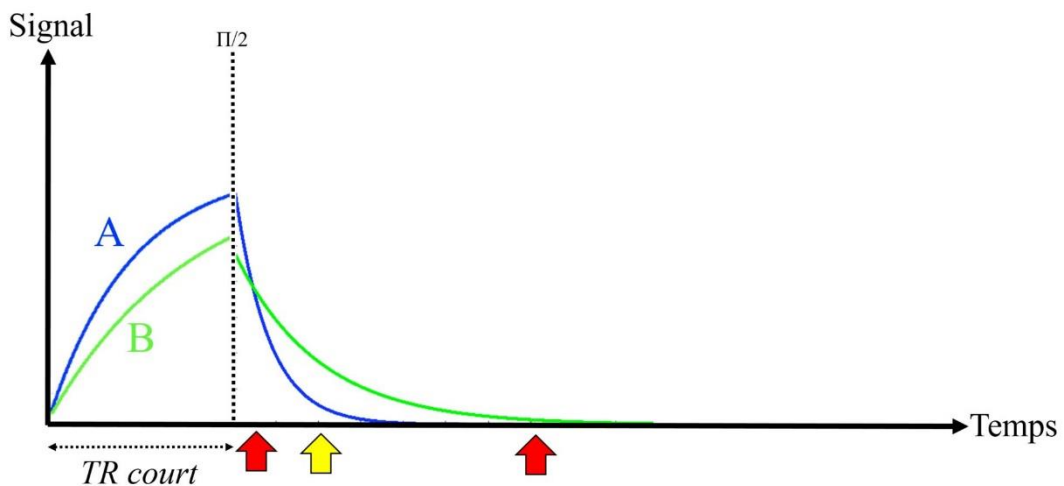


Figure 40 : Un TR court permet de distinguer les signaux des tissus A et B grâce à leur propriétés T1. Le TE pour lequel les deux tissus ont la même intensité ne donnera aucun contraste (flèche rouge). Il existe un TE optimal pour lequel le contraste entre les tissus est maximal (flèche jaune). Le contraste entre les tissus A et B dépend du TE choisit.

En résumé, raccourcir le TR a rendu visible une différence de propriété T1 entre deux tissus. Le temps TR correspond donc au temps que l'on laisse aux tissus pour récupérer partiellement ou totalement leur aimantation. Les images obtenues avec un TR court vont donner des intensités de signaux qui font apparaître la différence des propriétés T1 des tissus. On dit que ces images sont influencées par le T1 des tissus, donc pondérées T1.

Généralement, l'impulsion RF $\Pi/2$ qui permet de faire apparaître l'aimantation transversale est suivie d'une impulsion RF Π , qui va permettre de rephaser les spins. On recueille ainsi un deuxième signal, qui est un écho du premier.

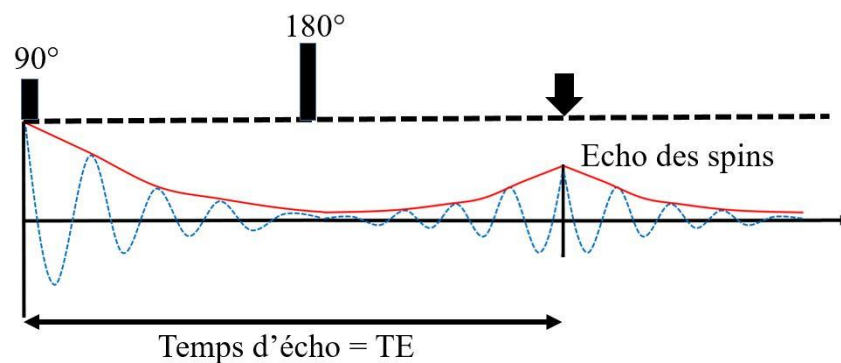


Figure 41 : Les temps qui séparent l'impulsion 90° de la lecture du signal écho est appelé temps d'écho (TE).

Le temps d'écho correspond au temps qui sépare l'impulsion 90° ($\Pi/2$) du recueil du signal. On appelle ce temps TE même si la séquence ne comporte pas d'écho. L'impulsion RF de 180° (Π) de rephasage est effectuée au milieu du temps d'écho, pour que le rephasage soit maximum au moment de la lecture. On peut recueillir autant d'échos que l'on donne d'impulsions de rephasage. Le TE s'exprime en millisecondes. Comme le temps de répétition, le temps d'écho influence le signal reçu. L'intensité des signaux diminue rapidement et la relaxation ne sera pas identique pour deux tissus qui ont des propriétés T2 différentes.

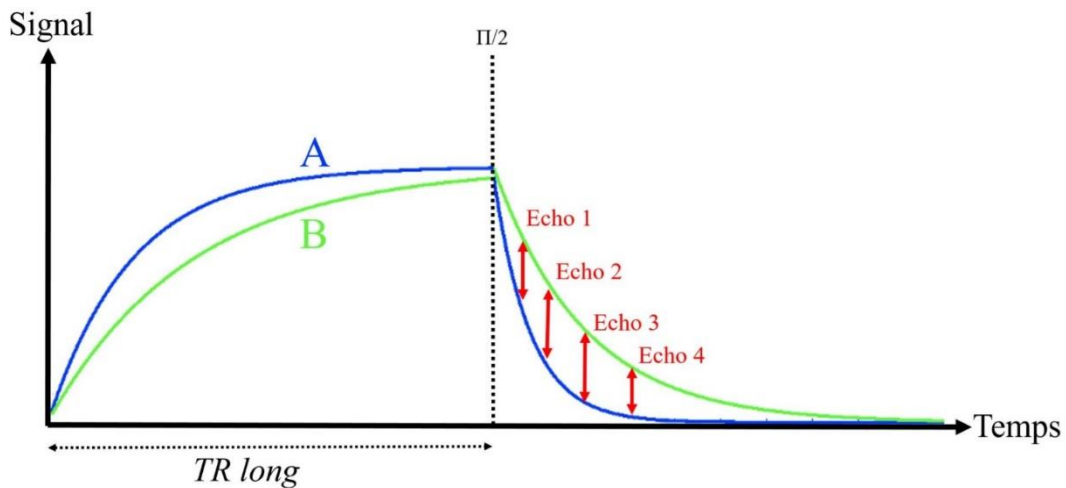


Figure 42 : Le contraste entre les deux tissus est plus important au deuxième écho qu'au premier.

Le choix du temps d'écho va influencer la différence d'intensité de signal des tissus. T1 et T2 sont des propriétés intrinsèques des tissus, on ne peut pas les modifier, mais on peut faire varier le TR et le TE. Les images peuvent être plus dépendantes de T1 ou de T2 en fonction des paramètres choisis. Dans l'exemple de la figure précédente, le deuxième écho donne plus de contraste que le premier, mais ça peut être l'inverse ou même donner deux signaux de même intensité sur un des deux échos. Dans le dernier cas, il n'y aura pas de différence d'intensité de signal entre les deux tissus. Le temps d'écho permet donc de choisir le temps que l'on va laisser avant de recueillir le signal, et donc de faire varier la décroissance du signal avant de l'enregistrer.

1.3.6 Du signal à l'image, le codage spatial

Dans le signal recueilli par l'antenne réceptrice, il y a de multiples informations indifférenciées. La transformée de Fourier permet de différencier ces informations en exprimant le signal non plus en temps mais en fréquence. Les protons ne résonnent pas exactement à la même fréquence en fonction de la nature du tissu. Les protons de l'eau ne résonnent par exemple pas à la même fréquence que les protons de la graisse. En effet, la fréquence est spécifique du noyau mais peut être modifiée par son environnement (eau et graisse par exemple), l'amplitude du signal qui en découle dépend lui de la quantité de protons mais aussi des propriétés T1 et T2 des tissus imagés. La différence de fréquence est très faible et augmente avec le champ magnétique. L'antenne va donc capter cette différence et le signal résultant va être un mélange des deux fréquences.

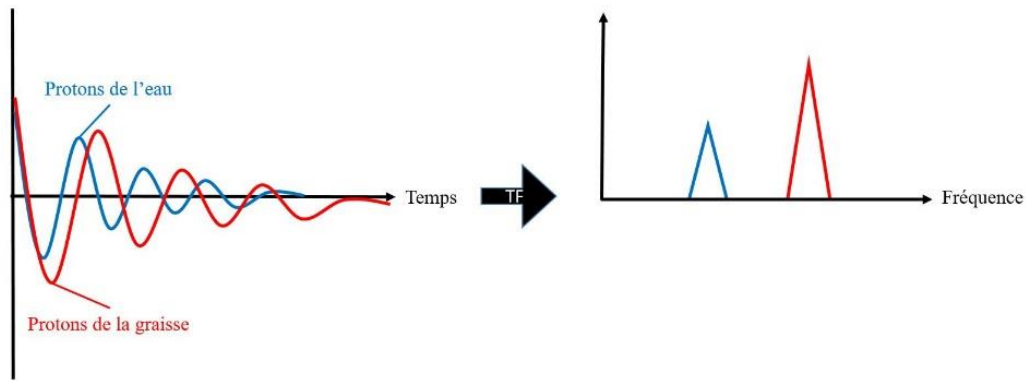


Figure 43 : La transformée de Fourier permet d'exprimer un signal en intensité par rapport à la fréquence à partir de l'intensité par rapport au temps.

Le passage du spectre de fréquence à l'image consiste à recueillir le signal pour chaque point donné dans un plan et un volume et à reconstruire l'image à partir de ces données de signal (Fig. 43). Le signal donne une information sur un point ou un volume unique. On peut choisir, selon les critères de l'image à remplir, un volume (un voxel) plus ou moins gros. La taille du voxel influera sur la finesse de l'image et sur l'intensité du signal, il faut donc trouver un compromis afin d'obtenir l'information que l'on souhaite contenue dans l'image. Pour reconstruire l'image on utilise des gradients qui vont superposer leur champ magnétique au champ magnétique principal. Les gradients utilisés en IRM sont linéaires et produisent des petits champs magnétiques grâce à des bobines. L'ouverture et la fermeture du courant électrique dans ces bobines permet d'établir ou de cesser instantanément le champ magnétique produit par les gradients. Les gradients permettent le remplissage de l'image, l'exemple choisi est une séquence écho de spin classique.

a) Le gradient de sélection

En IRM, une coupe anatomique est sélectionnée en l'excitant par une application simultanée d'un gradient de sélection G_z (parfois appelé G_s) et d'une impulsion RF de fréquence définie en fonction du champ magnétique. Comme précédemment mentionné, pour qu'un proton soit détectable à l'IRM, il doit résonner à la même fréquence que l'onde RF qui l'excite. L'onde RF appliquée avec une largeur spectrale $\Delta\omega$ autour de la fréquence centrale ω_0 va faire résonner les protons de la coupe à la position Δz . Tous les protons dans la bande de fréquence vont résonner et être détectables, tous les autres ne seront pas excités. En modifiant la pente du gradient, on peut sélectionner les protons qui rentreront dans la bande de fréquence et exclure les autres, c'est comme cela que l'on sélectionne l'épaisseur de la coupe. Dans la Figure 44,

lorsque le gradient est appliqué, le champ magnétique perçu par les spins est de $B_0 + z G_z$. Au point Z_0 , le champ magnétique perçu par les spins est égal à B_0 .

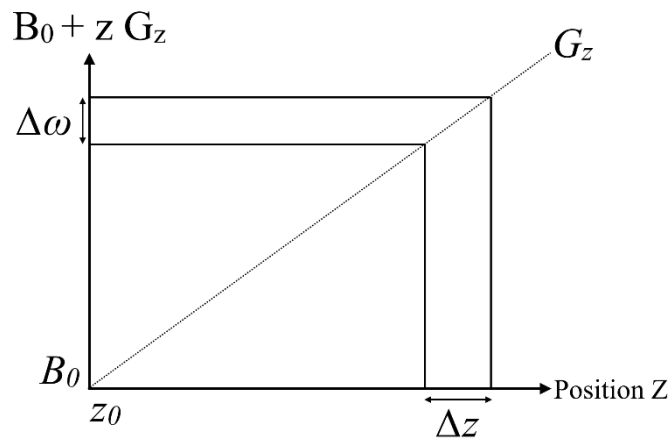


Figure 44 : Sélection de la coupe lors de l'application du pulse de sélection en présence du gradient G_z .

Les spins sélectionnés sont donc compris dans l'intervalle de fréquence, et tous les spins à l'extérieur de la coupe sont hors résonance, et ne seront pas excités. On peut donc moduler l'épaisseur de la coupe en agissant sur l'amplitude du gradient G_z ou sur la largeur de la bande de fréquence de l'onde RF. Si la bande de fréquence est étroite, le plan de coupe sera fin, si la bande de fréquence est large, le plan de coupe sera épais. Plus une coupe est fine, moins le signal sera intense. La position de la coupe est modifiée en déplaçant le spectre de fréquence de l'impulsion de sélection. Le gradient de sélection permet ainsi de sélectionner l'axe dans lequel l'objet sera imagé (transversal, sagittal ou coronal) en fonction de l'axe dans lequel le gradient de sélection G_z est appliqué.

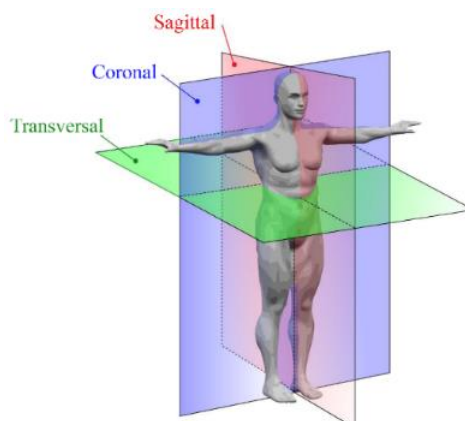


Figure 45 : Si le gradient de sélection est appliqué sur l'axe vert, on obtiendra des coupes transversales, sur l'axe rouge des coupes sagittales et sur l'axe bleu des coupes coronales. On peut aussi sélectionner des coupes obliques. Illustration modifiée depuis www.fracademic.com.

Le gradient de sélection est appliqué au moment de l'impulsion $\Pi/2$, il est positif puis généralement dans le sens inverse pour rephaser les spins dans l'épaisseur de coupe et diminuer l'influence des protons des coupes voisines.

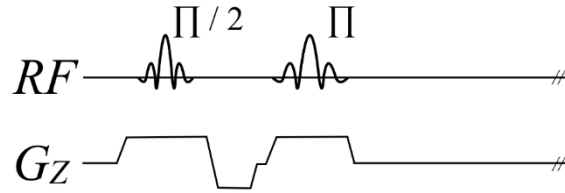


Figure 46 : Le gradient de sélection est appliqué pendant l'impulsion 90° . On peut appliquer un gradient alterne (représenté en dessous de l'axe). Les gradients alternes rephasent les spins pour leur donner une cohérence maximale au moment de l'écho des spins.

b) Le gradient de lecture

Après avoir sélectionné une coupe, on peut recueillir un signal au temps TE qui correspond à la décroissance du signal. Ce signal est en fait une moyenne de tous les signaux de la coupe mais il est impossible de déterminer d'où il provient. Le rôle du gradient de lecture G_x (ou gradient de fréquence, souvent appelé G_r) est de donner une indication de la localisation spatiale des signaux qui proviennent des spins en divisant les signaux.

Après l'impulsion Π , tous les spins de la coupe sélectionnée par le gradient de sélection vont précesser à la fréquence de Larmor, c'est-à-dire à la fréquence de l'onde RF. Les spins sont seulement soumis au champ B_0 . Le gradient de lecture est ensuite appliqué au moment de la lecture du signal le long de l'une des deux directions dans le plan de la coupe. L'intensité du gradient dépend de la localisation des spins de la gauche vers la droite dans le plan. Par exemple, les spins sur la gauche de l'image précessent peut être plus lentement que les spins sur la droite du plan. Il y a donc une variation de la fréquence le long de cette dimension x . Il y a un seul signal, une seule bobine, qui mesure la somme de toute l'information contenue dans la dimension mais le signal est bien composé d'un ensemble de signaux possédant une fréquence différente.

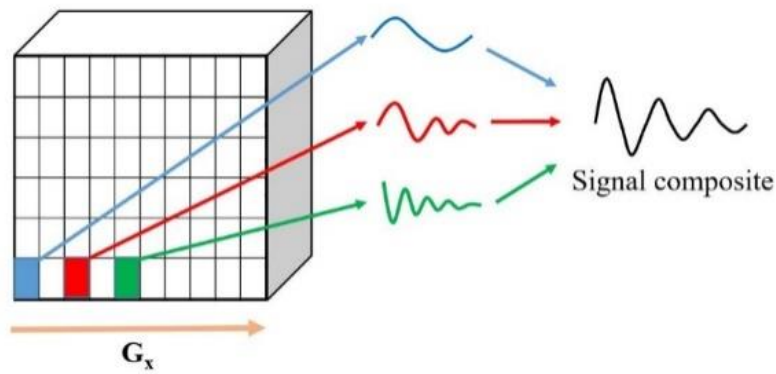


Figure 47 : Les signaux sont d'amplitude différente et chacune des amplitudes a une fréquence unique qui dépend de sa position de gauche à droite. Le signal composite qui en résulte est la somme de toutes les composantes (bleu, vert, rouge).

En appliquant une transformée de Fourier sur un signal composite, on peut décomposer les composantes de ce signal qui auront deux caractéristiques, son amplitude et sa fréquence.

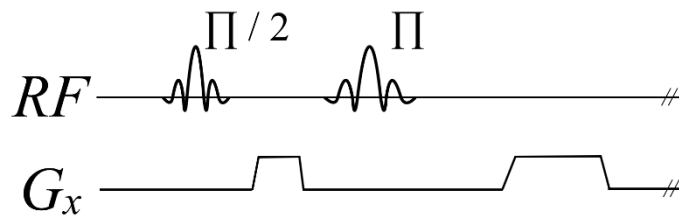


Figure 48 : Le gradient de lecture G_x est souvent accompagné d'un gradient alterne, qui sera donc un gradient de déphasage, positionné de manière à ce que le rephasage soit maximum au moment de la lecture du signal.

c) Le gradient de phase

La dernière étape pour reconstruire l'image se fait par l'application d'un dernier codage du signal dans la dernière direction, dans notre exemple suivant la direction y . Le dernier gradient utilisé est le gradient de phase G_y (souvent appelé G_{CP}). Les protons excités par une impulsion $\Pi/2$ précessent en phase, ils sont alignés. Si on introduit un gradient linéaire dans la direction y , les spins situés à des distances différentes vont se mettre à précesser à des fréquences différentes. Ils vont donc se déphaser les uns par rapport aux autres dans la direction y . Lorsque l'on arrête le gradient, les protons vont se remettre à précesser à la même fréquence mais ils vont conserver leur déphasage, qui dépend de la position des protons par rapport au gradient. Autrement dit, en fonction de la distance par rapport au centre du gradient, la variation de phase sera plus ou moins importante. La différence de phase donne une différence de fréquence dans le signal

mesuré. La fréquence dans la phase du signal donnera donc une information spatiale sur la position du proton.

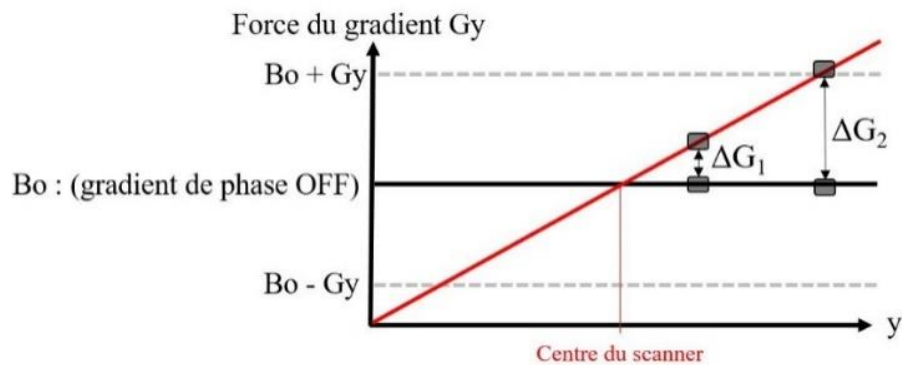


Figure 49 : Le proton G_1 est moins déphasé que le proton G_2 puisque la variation de phase ΔG_1 est plus faible que la variation ΔG_2 . Le proton G_1 a une amplitude de signal plus grande, on a donc une information sur sa position.

Chaque point est reconnu par sa phase et sa fréquence, en faisant varier le gradient G_y entre chaque impulsion, on augmente la différence de déphasage entre les protons et on encode donc la ligne suivante de l'image. Le gradient de codage de phase est appliqué dans l'intervalle de temps entre les impulsions à $\pi/2$ et à π .

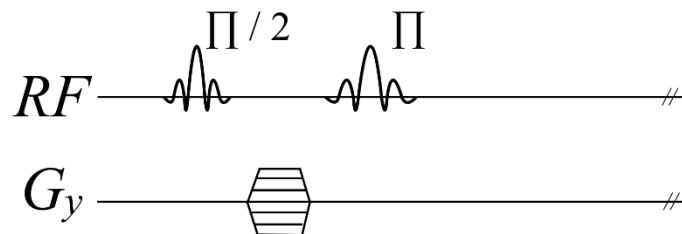


Figure 50 : Le gradient de codage de phase G_y varie continuellement sur 360° , c'est pour cela qu'on le représente des deux côtés de l'axe sur la séquence.

Le signal enregistré est placé dans l'espace K, il suffit donc d'appliquer une transformée de Fourier 2D inverse sur l'espace K pour obtenir une image. C'est le codage spatial effectué par les gradients précédemment présentés qui permet d'acquérir les données de l'image sous forme fréquentielle, adaptées à l'espace K. Les lignes de l'espace K sont balayées une par une, du haut vers le bas. Une ligne est balayée en entier à chaque répétition, elle contient donc à la fois les hautes et basses fréquences spatiales horizontales. Lorsque l'on passe d'une répétition à l'autre, il y a un changement dans l'intensité du gradient de codage de phase qui permet de changer de ligne : on recueille au début les hautes fréquences spatiales verticales positives puis les basses fréquences spatiales verticales, puis les hautes fréquences spatiales négatives.

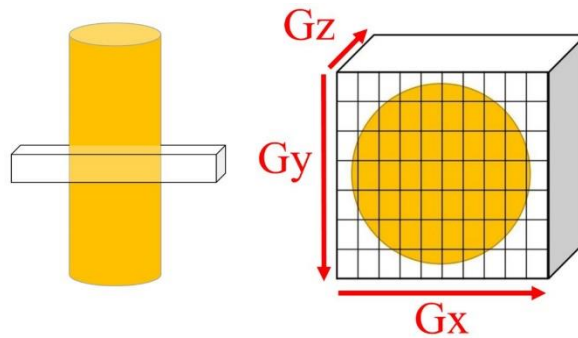


Figure 51 : L'onde RF $\Pi/2$ et le gradient de sélection G_z déterminent le départ de la séquence et la sélection de la coupe. La durée d'application du G_y est en général fixe, l'intensité du gradient de phase contrôle donc le déplacement sur l'axe vertical. L'intensité de G_x est fixe.

1.3.7 Séquences

Les séquences en IRM permettent de choisir un certain type d'impulsion, un temps de répétition TR et un temps d'écho TE, il existe donc une multitude de combinaison possible. Les séquences d'imagerie RMN sont composées de plusieurs impulsions RF d'angle différents et de gradients de champ magnétique.

a) Echo de spin

La séquence écho de spin a été la première séquence employée (chronogramme, Fig. 52). Depuis, cette séquence est une référence notamment pour le contraste. Une séquence en écho de spin comporte deux paramètres essentiels : le TR et le TE. En choisissant les bons paramètres de séquence (TR et TE), on peut obtenir des images pondérées en T1, T2 ou densité de protons. La coupe est sélectionnée par l'application de l'impulsion RF (A) et le gradient de sélection G_z (C). Pendant l'application de l'onde RF (A), l'aimantation transversale augmente et atteint son amplitude maximale à l'angle $\frac{\pi}{2}$. Après cette impulsion, l'aimantation revient à son état d'équilibre, sous l'influence des phénomènes de relaxation. On obtient donc à la fois une élimination de la composante transversale en fonction du T2 et une récupération de la composante longitudinale en fonction de T1. Le gradient de sélection est inversé (D) pour rephaser tous les spins de la coupe excitée. Le gradient de sélection (E) permet de travailler sur la coupe sélectionnée en (C). Le gradient de phase (F), est appliqué dans le même intervalle de temps pour différentes amplitudes. Un gradient de lecture (G) de préphasage est appliqué simultanément. Ensuite, un gradient de lecture (H) est appliqué pour permettre l'acquisition du signal au moment de l'écho. Dans le plan transversal, la perte d'amplitude du signal est due au déphasage des spins provoqué par leurs interactions entre eux (T2) et les inhomogénéités de

champ B_0 ($T2^*$). Le déphasage des spins intervient durant tout l'intervalle de temps $\frac{TE}{2}$, après l'excitation RF 90° . Après cet intervalle de temps, on applique une impulsion de rephasage de 180° (B).

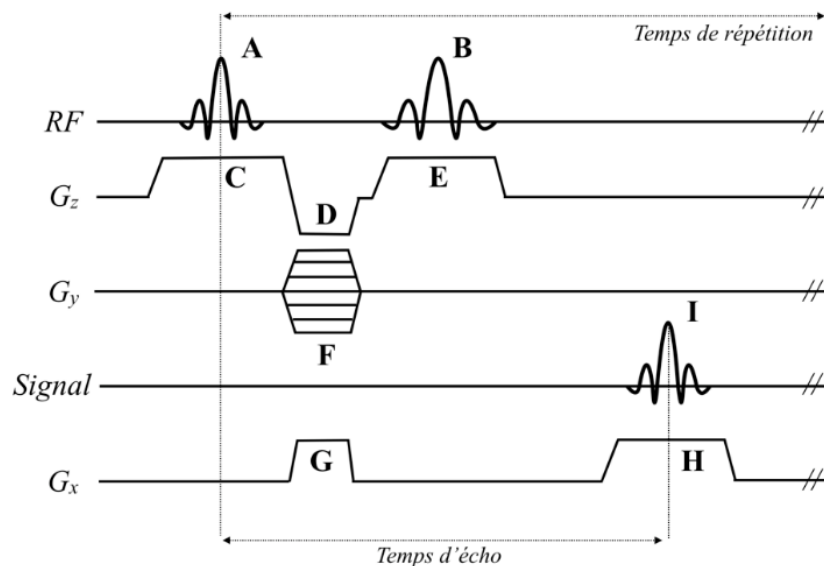


Figure 52 : Chronogramme de la séquence de l'écho de spin.

Les spins retrouvent ainsi leur cohérence de phase et l'aimantation transverse atteint à nouveau son maximum d'amplitude à TE. La deuxième impulsion (à 180°) permet de s'affranchir du déphasage dû aux inhomogénéités de champs B_0 ($T2^*$). Chaque fois qu'une impulsion 90° est envoyée, un écho provenant de l'ensemble des protons de la coupe est recueilli et numérisé. Chaque point de l'écho subit le gradient de phase G_y et le gradient de lecture G_x . En répétant à intervalles réguliers l'impulsion à 180° , on peut générer une série d'échos. La séquence est répétée en incrémentant le gradient du codage de phase jusqu'à ce que le plan de Fourier soit rempli. Chaque cycle est donc répété avec le nombre d'accumulation n choisi, ce qui permet de cumuler du signal et d'améliorer le signal sur bruit des images. Le temps d'acquisition des images sera défini par :

$$T_{acq} = TR \times N_y \times n$$

Avec TR, le temps de répétition de la séquence, N_y le nombre de ligne de codage par la phase et n le nombre d'accumulation, c'est à dire l'acquisition de la même ligne par la phase.

b) Echo de gradient

La principale différence d'une séquence écho de gradient est de ne pas avoir d'impulsion 180° de rephasage mais elle permet de former un écho par les gradients. Il n'est donc pas nécessaire

d'attendre que les spins se déphasent puis se rephasent après l'impulsion 180° . Le principal avantage de ce type de séquence est d'être beaucoup plus rapide qu'une séquence écho de spin et d'éliminer l'aimantation transversale résiduelle (chronogramme, Fig. 53). Après la sélection de coupe par l'impulsion RF (A) et par le gradient de sélection G_z (B), le gradient de sélection est inversé (C) pour rephaser tous les spins de la coupe sélectionnée. Le gradient de phase G_y (D) est appliqué dans le même intervalle de temps. Un gradient de lecture G_x (E) de déphasage est appliqué simultanément. Ensuite un gradient de lecture (F) est appliqué pour rephaser les spins au milieu de l'écho et pour permettre une acquisition du signal optimale (G). Des gradients de spoil (H) sont utilisés pour éliminer l'aimantation transversale résiduelle.

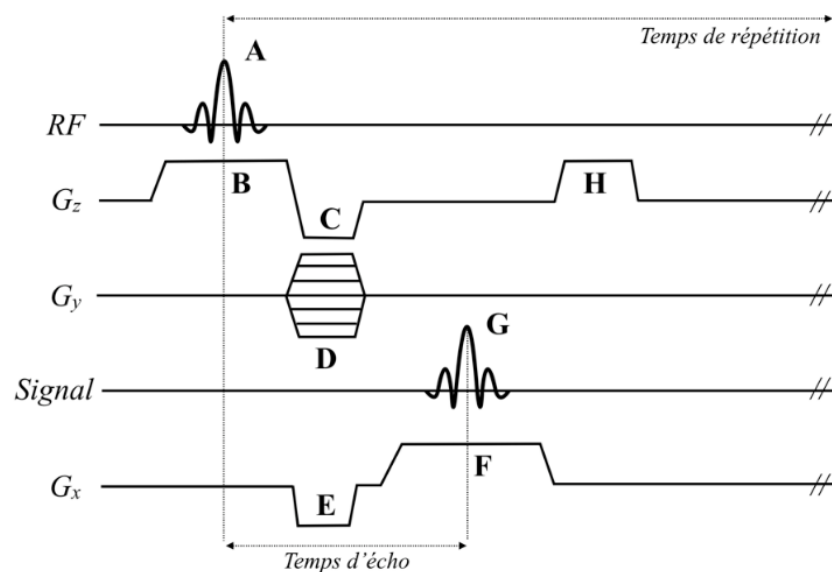


Figure 53 : Chronogramme de la séquence de l'écho de gradient.

Pendant le temps TE, le signal décroît en fonction de $T2^*$ car les hétérogénéités de champs ne sont pas compensées par les impulsions 180° . L'écho de gradient permet aussi de choisir l'angle de bascule, et il y a un bénéfice potentiel à choisir un autre angle de bascule qui est classiquement de 90° . Il est donc nécessaire de définir un angle de bascule optimal, appelé l'angle de Ernst. Dans la figure 54, l'intensité du signal sera maximale pour un angle inférieur à 90° .

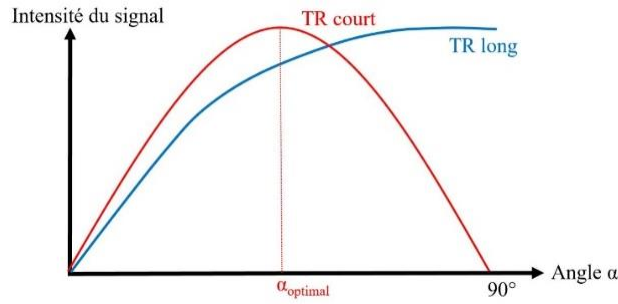


Figure 54 : Pour un TR court, le rephasage ne sera pas complet pour un angle de 90°

L'angle de Ernst dépend de la propriété physique du tissu T1, c'est-à-dire sa capacité à relaxer plus ou moins rapidement, mais aussi du TR choisi.

$$\cos \alpha = e^{-\frac{TR}{T1}}$$

La séquence d'écho de gradient permet l'utilisation des angles de bascule inférieurs à 90°, ce qui permet d'utiliser des TR plus courts et donc de diminuer les temps d'acquisition des images.

c) Pondération diffusion

La diffusion est un processus par lequel des molécules, telles que l'eau, sont transportées en raison d'un mouvement brownien aléatoire dans un milieu donné. Deux descriptions majeures et complémentaires de la diffusion ont été présentées par Fick et Einstein. Fick a décrit la diffusion comme le transport de matière d'une zone de forte concentration à une zone de faible concentration. Pour l'IRM, la diffusion la plus couramment étudiée est l'autodiffusion de l'eau.

La plupart des techniques d'imagerie de diffusion modernes utilisent une méthode de variations de gradient de champ pulsé pour obtenir une sensibilité à la diffusion. Dans ces séquences, deux gradients de champ magnétique sont appliqués séquentiellement pour déphaser puis rephaser les spins ou les protons. Les séquences basées sur la relaxation peuvent être transformées en séquences pondérées diffusion en ajoutant des gradients de diffusion autour du pulse à 180° dont on va moduler la durée δ , la séparation Δ et l'amplitude G :

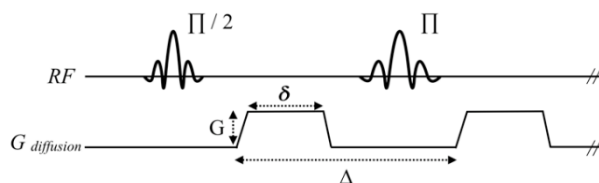


Figure 55 : Méthode de gradients de diffusion de Stejskal-Tanner.

Les spins qui se sont déplacés durant l'intervalle entre les deux gradients ne subissent pas un champ magnétique similaire à celui du premier gradient et ne sont donc pas rephasés, ce qui entraîne une perte nette de cohérence de spin et une perte quantifiable du signal IRM, qui peut être liée au coefficient de diffusion apparent (ADC). En modulant les paramètres de diffusion, on pondère plus ou moins l'image obtenue. Autrement dit, on peut rendre l'image plus ou moins sensible aux gradients de diffusion. Dans l'eau pure à 37 °C, D vaut approximativement $3 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, le déplacement d'une molécule d'eau en 50 ms est ainsi en moyenne de 17 μm .

Dans le cas le plus simple, avec une séquence spin-écho et en considérant pour le moment un seul coefficient de diffusion par voxel, on peut montrer que le signal et l'ADC sont liés comme suit :

$$S = S_0 e^{-bD}$$

S est le signal mesuré, S_0 le signal en l'absence des gradients, et D est l'ADC. Le facteur b de cette équation dépend de la force du gradient G, de la durée δ et de la séparation temporelle Δ entre les impulsions de gradient.

Pour les cas simples, le facteur b (exprimé en s/mm^2) s'exprime comme suit :

$$b = \gamma^2 G^2 \delta^2 \left(\frac{\Delta - \delta}{3} \right)$$

γ est une constante physique, le rapport gyromagnétique. D peut être déterminé à partir de l'équation ci-dessus si au moins deux images sont acquises avec des pondérations de diffusion différentes, et donc des facteurs b différents. A partir de cette équation, on peut déduire que tout mouvement de spins pendant le temps de diffusion entraînera une perte de signal IRM. Ainsi, l'IRM de diffusion est sensible à tout mouvement de molécules au cours de la séquence. Les coefficients de diffusion observés dans les tissus reflètent donc la diffusion dans plusieurs compartiments extracellulaires et intracellulaires, qui peuvent tous avoir des diffusivités différentes.

La diffusivité d'une substance n'est pas toujours identique dans toutes les directions. Par exemple, les coefficients de diffusion peuvent être relativement importants dans une direction et faibles dans une autre. La diffusion est plus généralement caractérisée par un tenseur, une matrice de neuf coefficients :

$$D = \begin{pmatrix} D_{xx} & D_{xy} & D_{xz} \\ D_{yx} & D_{yy} & D_{yz} \\ D_{zx} & D_{zy} & D_{zz} \end{pmatrix}$$

Ceci implique que neuf coefficients de diffusion devraient être mesurés pour obtenir le tenseur. Cependant, le tenseur de diffusion est symétrique, ce qui signifie que $D_{xy} = D_{yx}$, $D_{xz} = D_{zx}$ et $D_{yz} = D_{zy}$. Ainsi, seulement six coefficients de diffusion doivent être déterminés. La matrice de diffusion D est obtenue à partir des 6 équations provenant des 6 images dans lesquelles les gradients ont été appliqués dans différentes directions. La technique fournit donc une information précise sur la diffusion globale mais peut s'avérer coûteuse en terme de temps d'acquisition. L'anisotropie de chaque voxel est mesurée grâce au FA (fractional anisotropy) qui varie de 0 (diffusion isotropique) à 1 (diffusion totalement anisotropique). Lorsque les axes du système de mesure coïncident exactement avec les axes de l'objet étudié (comme les fibres de la substance blanche), les éléments non diagonaux du tenseur (D_{xy} , D_{xz} et D_{yz}) deviennent nuls, et les diffusivités diagonales mesurées D_{xx} , D_{yy} , et D_{zz} sont appelées les diffusivités principales, souvent appelées λ_1 , λ_2 et λ_3 . Les diffusivités le long des trois axes principaux sont définies par les vecteurs propres où λ_1 (vecteur propre primaire) représente la direction et l'amplitude du vecteur de diffusion longitudinale, tandis que λ_2 et λ_3 représentent des vecteurs le long des axes mineurs transversaux. Les grandeurs de ces vecteurs sont utilisées pour calculer un certain nombre d'indices dont les paramètres couramment utilisés sont décrits ci-dessous :

- ADC longitudinal (ADC_{\parallel} ou $ADC_{//}$) : vecteur propre primaire λ_1 mesurant la diffusion dans l'axe longitudinal, le long de la moelle épinière par exemple considéré comme un marqueur de l'intégrité axonale (Sotak 2002; J. Xu et al. 2008; Fraidakis et al. 1998).

- ADC transversal (ADC_{\perp} ou ADC_{\perp}) : moyenne de deux vecteurs propres mineurs λ_2 et λ_3 mesurant la diffusion dans les axes transversaux, perpendiculairement aux fibres de myéline de la moelle épinière par exemple, considéré comme un marqueur de myélinisation ou de démyélinisation (Schwartz et al. 2005; Gulani et al. 2001; Bonny et al. 2004).

$$ADC_{\perp} = \frac{\lambda_2 + \lambda_3}{2}$$

La diffusivité moyenne est obtenue grâce à la moyenne des valeurs propres et donne un indice des mouvements moyens des molécules observées.

Dans un environnement où les obstacles à la diffusion sont identiques dans toutes les directions, la diffusion est considérée comme isotrope. C'est le cas par exemple dans un verre d'eau, dans

lequel les molécules peuvent diffuser pendant des durées relativement longues, elles ne rencontreront probablement pas pour autant de barrière à la diffusion. Le mouvement n'est pas favorisé dans une direction préférentielle. Dans ce cas, les coefficients de diffusion sont équivalents dans toutes les directions. Les tissus biologiques sont particulièrement hétérogènes du fait de la présence de nombreux compartiments présentant des diffusivités différentes. Le mouvement des molécules d'eau pendant le déplacement aléatoire par diffusion est donc entravé par les limites de ces compartiments et d'autres obstacles moléculaires. Une condition d'isotropie n'est donc pas souvent rencontrée dans les tissus, puisque les membranes cellulaires et l'organisation générale favorisent la diffusion dans une direction.

Une caractéristique déterminante du tissu neuronal est sa structure fibrillaire. Le tissu nerveux se compose d'axones majoritairement myélinisés étroitement emballés et alignés qui sont entourés de cellules gliales et sont souvent organisés en faisceaux. En conséquence, les mouvements des molécules d'eau sont plus entravés dans une direction perpendiculaire à l'orientation axonale que parallèlement à celle-ci (Fig. 56). Les déplacements parallèles aux fibres sont donc de manière générale plus grands que les déplacements perpendiculaires.

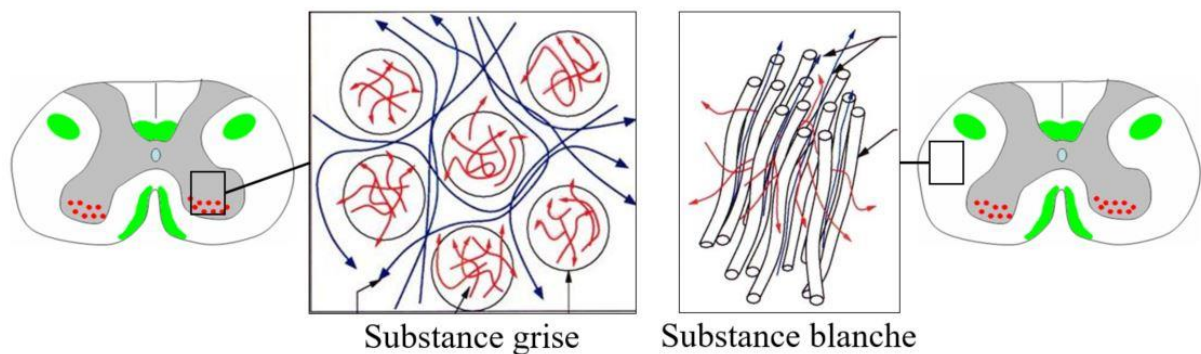


Figure 56 : La substance grise est un tissu isotropique, tandis que la substance blanche est un tissu plutôt anisotropique.

Lorsque l'on change la direction de diffusion par un flux, le déplacement n'est plus isotropique, l'environnement devient anisotropique. Dans un environnement anisotrope, le coefficient de diffusion résultant va dépendre de la direction de la mesure, que l'on peut facilement contrôler avec les séquences de diffusion. On peut en effet choisir d'appliquer les gradients de diffusion dans une direction donnée, ou dans le plus de directions possible.

1.3.8 L'IRM sur les modèles animaux après une lésion médullaire

Chez les rongeurs, le diamètre moyen de la moelle épinière varie de 2 à 3mm. La petite taille de la colonne vertébrale et la structure osseuse qui l'entoure rendent l'IRM de la souris ou du rat relativement difficile. Les systèmes de micro-imagerie à champ élevé sont adaptés à l'investigation de la moelle épinière du rongeur car ils offrent à la fois un signal élevé par rapport aux scanners cliniques (1.5 T ou 3 T) et des gradients puissants. La plupart des études IRM sur le rongeur sont effectuées sur des appareils dédiés au petit animal, mais il existe quelques études dans lesquelles un scanner clinique 3T est utilisé (Sandner et al. 2009). Il existe une importante variété d'appareils dédiés au petit animal, dont le champ magnétique varie de 4.7 à 17.6 Tesla. En 1998, Fraidakis développe sur un IRM 4.7T des images hautes résolution sur le rat permettant de distinguer la moelle épinière saine et la moelle épinière ayant subi une transection (Fraidakis et al. 1998). La même année, Benveniste présentait l'anatomie de la moelle épinière du rat avec des images pondérées en T2 acquises avec un appareil 7.1T (Benveniste et al. 1998). En plus d'aimants à champ élevé, l'utilisation d'antennes RF adaptées au petit animal est souvent systématisée pour optimiser les études sur les rongeurs. Certaines études nécessitent l'utilisation d'antennes volumiques (Franconi et al. 2000; Callot, Duhamel, and Cozzone 2007), d'autres les antennes de surface (Behr et al. 2004), et de nombreuses investigations sont effectuées pour mettre au point des antennes encore plus performantes et adaptées à la thématique (Mehmet Bilgen 2004; Coillot et al. 2016).

Les principales applications de résonance magnétique pour étudier la moelle épinière chez les modèles de rongeurs sont les pondérations en T1 et en T2 pour étudier la morphologie et la pondération en diffusion pour étudier la structure tissulaire.

Ces techniques peuvent être réalisées sur la plupart des systèmes IRM. Elles permettent d'obtenir des informations *in vivo* sur la physiopathologie des lésions de la moelle épinière. Les avancées de la technologie, comme les nouvelles séquences, les gradients plus puissants ou la conception d'antennes spécialisées permettent d'être plus sensible, dans un temps d'acquisition plus court. Il est en effet nécessaire de raccourcir les temps d'acquisitions car dans la plupart des études, les animaux sont anesthésiés par inhalation d'un mélange d'air et d'isoflurane, un anesthésiant vétérinaire très utilisé. Le débit et la concentration d'isoflurane doivent être optimisés pour obtenir une respiration régulière afin d'avoir la possibilité d'effectuer une synchronisation avec la respiration. On ne peut donc anesthésier un animal trop longtemps, ses

paramètres vitaux (respiration et électro cardiogramme) sont d'ailleurs monitorés pendant les acquisitions afin de s'assurer de sa bonne santé.

Pour étudier la morphologie de la moelle épinière du rongeur, des échos de spin conventionnels sont le plus souvent utilisés. Lorsque les séquences doivent être plus rapides, l'écho planar (EPI) est privilégié. Dans les deux cas, les TR et les TE doivent être optimisés pour obtenir des contrastes adaptés à ce que l'on souhaite identifier. Il est donc nécessaire de mesurer les T1 (séquence saturation récupération ou inversion récupération) et T2 (CPMG) des différentes régions de la moelle épinière afin d'adapter le TR et le TE des séquences. Les images pondérées en T1 et T2 permettent une évaluation de taille volumétrique et fournissent des informations complémentaires sur la pathologie. En effet, les images pondérées en T1 mettent en évidence de façon optimale l'anatomie, la graisse et les tissus mous, tandis que les images pondérées en T2 mettent en évidence de manière optimale la présence de fluide et de pathologie comme par exemple les tumeurs, inflammations, traumatismes et œdèmes. En plus des contrastes standard T1 et T2, l'IRM de diffusion offre une excellente différenciation entre la substance grise et la substance blanche en raison des différences de mobilité aléatoire des molécules d'eau au sein de l'organisation tissulaire microscopique (Basser and Jones 2002; Loher et al. 2003; Song et al. 2003). L'imagerie pondérée en diffusion (DWI) et l'imagerie du tenseur de diffusion (DTI) offrent des informations utiles sur la microarchitecture tissulaire. Les changements dans les mesures de diffusion sont généralement corrélés avec les changements physiopathologiques et avec l'histopathologie.

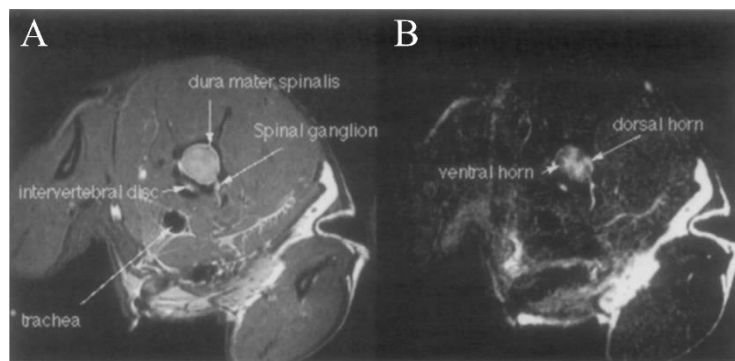


Figure 57 : IRM pondérée en T2 (A) et en diffusion (B) de moelle cervicale de rat. Les images ont été acquises *in vivo* au niveau vertébral C3 (Benveniste et al., 1998).

Les mesures de diffusion peuvent être considérées comme un complément à l'imagerie de routine, car les variations peuvent indiquer une altération ou une perturbation des tissus dans les régions normales en IRM conventionnelle (Ford et al. 1994; Deo et al. 2006), suggérant le potentiel de cette technique pour détecter des pathologies difficiles à détecter. Les techniques de diffusion dans les études sur les rongeurs sont généralement basées sur des échos de spin conventionnels, mais il a également été démontré que les séquences écho de spin échos planar (SE-EPI) fonctionnent aussi bien pour les études chez le rat que chez la souris (Fenyés and Narayana 1999; Callot, Duhamel, and Cozzone 2007; Callot et al. 2008, 2010). Le contraste de diffusion est obtenu en ajoutant des gradients de diffusion pendant la phase préparatoire d'une séquence d'imagerie. La plupart des mesures de diffusion rapportées dans la littérature sont déterminées à partir d'images pondérées en diffusion acquises avec des gradients appliqués parallèlement et perpendiculairement à l'axe de l'aimant plutôt que sur la détermination complète du tenseur de diffusion (Fraidakis et al. 1998; Bonny et al. 2004; Eric D. Schwartz et al. 2005). Cependant, le tenseur de diffusion est particulièrement utile pour évaluer les altérations dans les tractus de la substance blanche qui se produisent après une lésion médullaire (Bonny et al. 2004; Bilgen 2004).

1.4 Objectifs de la thèse

1.4.1 Comparaison de deux souches de souris avec l'IRM *in vivo*, l'IRM *ex vivo* et l'histologie

L'objectif est de mettre au point un suivi longitudinal en IRM *in vivo* pondérée en T2 et en diffusion qui permettrait d'identifier la progression d'une lésion médullaire dans différents contextes chez deux souches de souris ayant une récupération fonctionnelle différente. Les IRM *ex vivo* pondérée en T2 et en diffusion sont ensuite optimisées afin de les comparer avec les informations obtenues en IRM *in vivo*. Des techniques d'histologie plus classique doivent ensuite être utilisées pour obtenir des informations supplémentaires sur la réorganisation tissulaire, notamment en évaluant la réactivité gliale respective des deux souches de souris.

1.4.2 Evaluation avec l'IRM de diffusion d'une stratégie thérapeutique

L'objectif est d'évaluer l'impact d'une stratégie thérapeutique consistant à moduler certains événements menant à la mise en place de la cicatrice gliale, principale limitation de la repousse axonale après une lésion médullaire. Cette modulation, consiste en une déplétion pharmacologique transitoire de la prolifération des microglies et son évaluation est réalisée par un suivi comportemental, un suivi en imagerie puis en histologie des animaux lésés, traités ou non.

1.4.3 Mise au point d'un modèle de lésion médullaire sur le primate non humain

L'objectif est d'utiliser l'IRM *in et ex vivo* pour caractériser un nouveau modèle animal de lésion de la moelle épinière. La caractérisation neuroanatomique de la moelle épinière d'un primate non-humain (*Microcebus murinus*) obtenue en IRM est comparée avec des techniques d'histologie plus classiques (coloration, immunomarquage), puis comparées à d'autres espèces, comme les rongeurs ou l'Homme. L'évaluation motrice de l'effet d'une lésion de la moelle épinière sur les primates non-humains est effectuée avec divers tests comportementaux, comme l'Open field, le CatWalkTM ou le grip test.

2. Matériel et méthodes

2.1 Animaux

Les procédures expérimentales utilisées respectent la loi Européenne sur l'expérimentation animale (2010/63/EU). L'étude a été approuvée par le service vétérinaire, par le comité d'éthique d'expérimentation animale régional, et par le Ministère de l'Education et de la Recherche (numéro d'autorisation 34118). Le maximum a été fait afin de minimiser le nombre d'animaux utilisés et la souffrance engendrée par l'expérimentation.

- Souris Aldh111-EGFP :

Les souris transgéniques « Aldehyde dehydrogenase 1 family member L1 » (Aldh111-EGFP) ont été achetées au centre « Mutant Mouse Regional Resource » (University of California, Davis, USA) et ont été maintenues sous un fond génétique Swiss Webster. Les souris Aldh111-EGFP expriment une protéine fluorescente verte (Green Fluorescent Protein – GFP) sous le contrôle du promoteur Aldh111 qui est un marqueur spécifique pan-astrocytaire (Cahoy et al. 2008).

- Souris CX3CR1^{+eGFP} :

Les souris transgéniques CX3CR1^{+eGFP} ont été obtenues auprès du Dr Dan Littman (Institut médical Howard Hughes, Institut Skirball, NYU Medical Center, New York, Etats-Unis) et maintenues sous un fond génétique C57BL/6. Les souris transgéniques CX3CR1^{+eGFP} expriment la GFP sous le contrôle du promoteur Cx3cr1. De fait, la GFP est sélectivement exprimée par les cellules de la lignée myéloïde dont les microglies, les monocytes circulants et les macrophages résidents font partie (Jung et al. 2000).

Pour les deux souches de souris, seuls les animaux hétérozygotes ont été utilisés. Dans la suite du document, afin de faciliter la lecture, les souris seront nommées plus simplement CX3CR1 et Aldh111.

Toutes les souris ont été hébergées dans des conditions contrôlées (température et cycle lumière / obscurité de 12 h). Seules les souris femelles ont été utilisées durant ces expérimentations. Le nombre de souris utilisées à chaque temps d'analyse pour chaque étude et pour chaque modalité a été répertorié dans le Tableau 1. Les temps d'analyse post-lésionnels sont choisis pour évaluer les altérations tissulaires à la fois dans la phase aiguë (24 et 72 heures) et dans la phase chronique (4, 6 semaines et 3 mois) suivant une lésion de la moelle épinière.

Etude	Critères / paramètres étudiés	Modalités expérimentales	Temps d'analyse	Nombre d'animaux	Référence manuscrit
Comparaison des souches	Aldh111-EGFP vs CX3CR1 ^{+/eGFP}	Comportement	<u>Avant lésion</u> - 1 semaine - 24 heures <u>Après lésion</u> - 24 et 72 heures - 1, 2, 3, 4, 5 et 6 semaines	<u>Aldh111</u> - 18 lésées - 6 non-lésées <u>CX3CR1</u> - 20 lésées - 8 non-lésées	3.1
Comparaison des souches	Aldh111-EGFP vs CX3CR1 ^{+/eGFP}	IRM <i>in vivo</i> T2	<u>Après lésion</u> - 24 et 72 heures - 1, 3 et 6 semaines	<u>Aldh111</u> - 6 lésées - 4 non-lésées <u>CX3CR1</u> - 6 lésées - 3 non-lésées	3.3
Comparaison des souches	Aldh111-EGFP vs CX3CR1 ^{+/eGFP}	IRM <i>ex vivo</i> T2	<u>Après lésion</u> - 6 semaines (à la suite de l'IRM <i>in vivo</i>)	<u>Aldh111</u> - 6 lésées - 4 non-lésées <u>CX3CR1</u> - 6 lésées - 3 non-lésées	3.4
Comparaison des souches	Aldh111-EGFP vs CX3CR1 ^{+/eGFP}	IRM <i>ex vivo</i> diffusion	<u>Après lésion</u> - 24 et 72 heures - 1, 2, 4 et 6 semaines - 3 mois	<u>Aldh111</u> - Entre 5 et 9 par temps - 3 non-lésées <u>CX3CR1</u> - Entre 5 et 9 par temps d'analyse - 3 non-lésées	3.6
Comparaison des souches	Aldh111-EGFP vs CX3CR1 ^{+/eGFP}	IRM <i>in vivo</i> diffusion	<u>Après lésion</u> - 72 heures - 1, 2, 4 et 6 semaines	<u>Aldh111</u> - 7 lésées <u>CX3CR1</u> - 7 lésées	3.7
Comparaison des souches	Aldh111-EGFP vs CX3CR1 ^{+/eGFP}	Bleu de toluidine	<u>Après lésion</u> - 24 et 72 heures - 1, 2, 4 et 6 semaines -3 mois	<u>Aldh111</u> - Entre 4 et 10 par temps d'analyse <u>CX3CR1</u> - Entre 3 et 8 par temps d'analyse	3.4.3 3.6.4 3.7.4
Comparaison des souches	Aldh111-EGFP vs CX3CR1 ^{+/eGFP}	- GFAP - IBA1 - SERT	<u>Après lésion</u> - 24 et 72 heures - 1, 2, 4 et 6 semaines -3 mois	<u>Aldh111</u> - Entre 4 et 10 par temps d'analyse <u>CX3CR1</u> - Entre 3 et 8 par temps d'analyse	3.8

Tableau 1 : Animaux utilisés par temps d'analyse dans l'étude de comparaison des souches (n=140).

Etude	Critères / paramètres étudiés	Modalités expérimentales	Temps d'analyse	Nombre d'animaux	Référence manuscrit
Comparaison des modalités	IRM T2 vs IRM diffusion vs Histologie	- IRM <i>in vivo</i> T2 - IRM <i>ex vivo</i> T2 - IRM <i>ex vivo</i> diffusion - IRM <i>in vivo</i> diffusion - Bleu de Toluidine	<u>Après lésion</u>	<u>Aldh111</u>	3.4.4
			- 6 semaines	- Entre 4 et 10 par temps d'analyse	3.6.5
			- 3 mois		3.7.5
				<u>CX3CRI</u>	3.9.3
				- Entre 3 et 8 par temps d'analyse	

Tableau 2 : Animaux utilisés pour comparer les modalités d'analyse 6 semaines après la lésion (n=26)

Etude	Critères / paramètres étudiés	Modalités expérimentales	Temps d'analyse	Nombre d'animaux	Référence manuscrit
Traitement au GW2580	GW2580 vs CTL	-Comportement	<u>Avant lésion</u> - 5, 2 et 1 semaine avant lésion -24 heures <u>Après lésion</u> - 3 et 5 jours - 1, 2, 3, 4, 5 et 6 semaines	<u>Traitées</u> - 12 souris <u>Non-traitées</u> - 12 souris	3.9.2
Traitement au GW2580	GW2580 vs CTL	- IRM <i>in vivo</i> diffusion	<u>Après lésion</u> - 4 et 6 semaines	<u>Traitées</u> - 6 lésées <u>Non-traitées</u> - 6 lésées	3.9.3
Traitement au GW2580	GW2580 vs CTL	- IRM <i>ex vivo</i> diffusion - Bleu de toluidine -BrdU - GFAP - IBA1	<u>Après lésion</u> -2 semaines (BrdU) - 6 semaines	<u>Traitées</u> -5 lésées (2 semaines) - 12 lésées (6 semaines) - 4 non-lésées <u>Non-traitées</u> -5 lésées (2 semaines) - 12 lésées -3 non-lésées	3.9.1 3.9.3 3.9.5

Tableau 3 : Animaux utilisés pour comparer les souris traitées au GW2580 et les souris non-traitées

2.2 Protocole chirurgical – Lésion de la moelle épinière

A l'âge de 3 mois, les souris femelles adultes sont anesthésiées par inhalation de gaz d'isoflurane à 1,5% (Aerane, Baxter, Deerfield, IL, USA). Les muscles et la peau au niveau thoracique sont incisés et maintenus écartés par des sutures afin de garantir un champ opératoire large et donc une visualisation optimale de la colonne vertébrale.

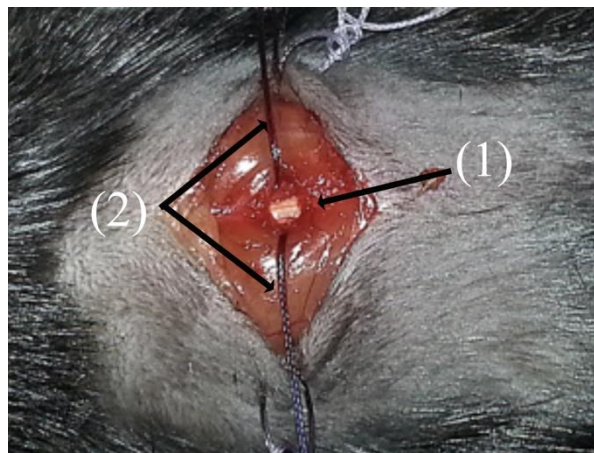


Figure 58: Champ opératoire permettant l'hémisection latérale de la moelle épinière. Les sutures (2) permettent d'écartier la peau et le muscle afin de visualiser la colonne vertébrale, puis la moelle épinière (1) après la laminectomie.

Une laminectomie, consistant à retirer la lame vertébrale postérieure, est ensuite réalisée au niveau thoracique 9 (T9). L'hémisection latérale (HS) est effectuée du centre vers la périphérie gauche de la moelle épinière sous microscope (Leica M80, Nanterre, France) en utilisant un micro scalpel (10315-12, Fine Science Tools, Heidelberg, Allemagne), comme décrit dans de précédentes études de l'équipe (Noristani et al. 2015; Noristani et al. 2016). L'hémisection latérale a été choisie afin de reproduire les conditions les plus proches possible de la clinique, sachant que les lésions incomplètes sont les plus fréquentes (1.2) tout en ayant un modèle chirurgical reproductible. La lésion a été effectuée au niveau T9 afin d'obtenir une monoplégie, n'affectant pas les fonctions respiratoires. La lésion étant réalisée du côté gauche de la moelle épinière, chaque souris a présenté une paralysie du membre inférieur gauche. Les muscles et la peau ont été suturés et les souris ont été surveillées jusqu'au réveil.

Soins post-opératoires : La vessie des souris lésées est vidée manuellement deux fois par jour jusqu'à récupération complète du contrôle des sphincters, en général après 4 à 7 jours. Le poids des souris est contrôlé avant la chirurgie et est suivi jusqu'à la fin de l'expérimentation.

2.3 Préparation des tissus pour les études *ex vivo*

Il est nécessaire de fixer les tissus d'intérêt afin de préserver au mieux leur intégrité. Les tissus sont fixés grâce à une perfusion intracardiaque au paraformaldéhyde 4%. Après la dissection et après l'IRM *ex vivo*, les tissus sont congelés afin d'être coupés au cryostat en vue de leur analyse histologique.

2.3.1 Perfusion intracardiaque

A la fin de chacune des expérimentations, les souris sont profondément anesthésiées avec une injection intra-péritonéale de tribromoéthanol (500mg/kg). La cage thoracique est ouverte, le diaphragme sectionné en prenant soin de ne pas léser le foie ou les poumons. Le cœur est dégagé et une aiguille reliée à une pompe péristaltique est insérée dans le ventricule gauche. Une fois l'aiguille placée, l'oreillette droite est sectionnée à l'aide de ciseaux courbés afin de stopper le retour du sang vers le cœur (Fig. 59).

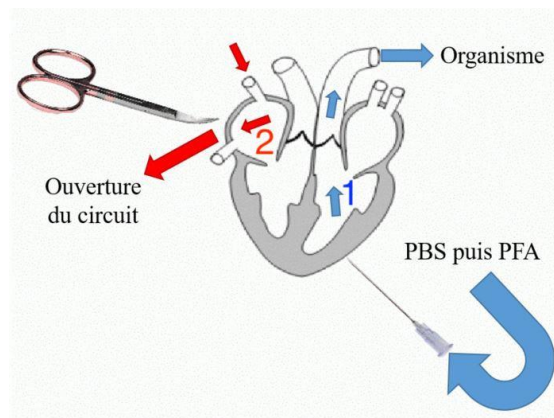


Figure 59 : Schéma général de la perfusion intracardiaque. Le PFA est injecté par le ventricule gauche (1), puis est évacué en incisant l'oreillette droite (2).

La perfusion intracardiaque est effectuée en injectant environ 40mL de phosphate buffer saline (PBS, tampon phosphate) à pH 7.2 afin de retirer le sang du système circulatoire et ainsi éviter la formation de caillots. Du paraformaldéhyde 4% (Sigma Aldrich) est ensuite injecté dans la circulation afin de fixer tous les tissus de la souris. Les solutions injectées durant la perfusion, et en particulier le PBS, doivent être froides.

2.3.2 Dissection – Prélèvement de la moelle épinière

Les moelles épinières sont prélevées pour réaliser les IRM *ex vivo* et l'histologie. Les tissus entourant la colonne vertébrale sont enlevés, puis chaque vertèbre est coupée à l'aide d'une paire de ciseaux courbés en commençant par la partie cervicale. Les vertèbres sont ensuite retirées

avec des pinces fines. Les racines médullaires sont coupées afin de ne pas engendrer de traction sur la moelle épinière qui pourrait être la source d'artefact en IRM et en histologie. La moelle épinière est ensuite détachée de la colonne vertébrale. Une fois la dissection terminée, une post-fixation de 2h est effectuée dans du PFA 4%. Les tissus sont finalement conservés dans du PFA 1% jusqu'à l'IRM *ex vivo*.

2.3.3 Congélation et coupe au cryostat

Après l'IRM *ex vivo*, les tissus sont congelés afin de les couper au cryostat. Les coupes fines obtenues (14µm) permettent une observation détaillée de la structure du tissu. Pour cela, les moelles épinières sont immergées dans du sucrose 30% afin de produire un effet cryoprotecteur ; une forte concentration en glucose induit par osmolarité le remplacement de l'eau des tissus par du glucose, ce qui permet de préserver l'intégrité des tissus lors de la congélation. Les moelles épinières ont ensuite été placées dans des moules de 1.4 x 1.4 x 0.3 cm et recouvertes de Tissue-Tek O.C.TTM Compound (Sakura). Cette substance liquide forme autour du tissu une matrice qui devient solide une fois congelée et permet une cryoprotection des tissus. Pour cela, les moules ont été placés au congélateur à -80° pendant 2h, avant d'être conservés à -20° jusqu'à la coupe au cryostat.

Les coupes de 14µm de moelle épinière sont réalisées au cryostat à -20° (MICROM HM520). Les coupes sont montées sur des lames Superfrost Plus (Thermofisher Scientific, Illkirch, France) chargées positivement afin de garantir, par effet électrostatique, une bonne adhérence du tissu chargé négativement grâce au PFA utilisé lors de la perfusion intracardiaque. Les lames sont ensuite conservées au congélateur -20° jusqu'au début de l'étude histologique.

2.4 Etude comportementale

L'analyse comportementale dans les différentes études a été axée autour de deux tests automatisés, le CatWalk et l'Open field. Ces deux tests ont permis d'évaluer la sensibilité tactile, l'activité motrice spontanée, l'anxiété et la locomotion dynamique des souris avant et après une lésion médullaire. Les souris lésées et non-lésées ont été suivies en analyse comportementale à différents moments, après avoir suivi une phase d'habituation (en étant soumise aux tests sans qu'aucune mesure ne soit enregistrée). L'objectif étant de ne pas biaiser les résultats liés au stress des animaux. Le nombre d'animaux utilisés pour les différentes études comportementales, ainsi que les temps d'analyse choisis ont été répertoriés dans le Tableau 2 (2.1).

2.4.1 CatWalk™

L'analyse des patrons de marche dynamique a été réalisée en utilisant un appareil d'enregistrement CatWalk™ (Version 7.1, Noldus, Wageningen, Pays-Bas). Cette méthode d'analyse donne une information fine, dynamique et semi-automatisée de la marche. La souris est placée sur une plaque en verre illuminée dans une pièce sans source lumineuse externe, tandis qu'une caméra située sous la plaque en verre enregistre les pas sur une distance de déplacement de 30cm.

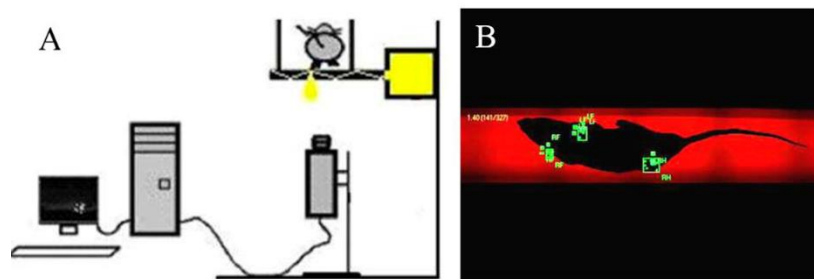


Figure 60: Analyse « CatWalk ». Installation du « CatWalk » (A) permettant l'enregistrement des positions des pattes (B, empreintes verte) par la caméra positionnée sous l'animal.

Paramètres CatWalk™ analysés :

Tous les paramètres analysés sont obtenus à partir du cycle de pas.

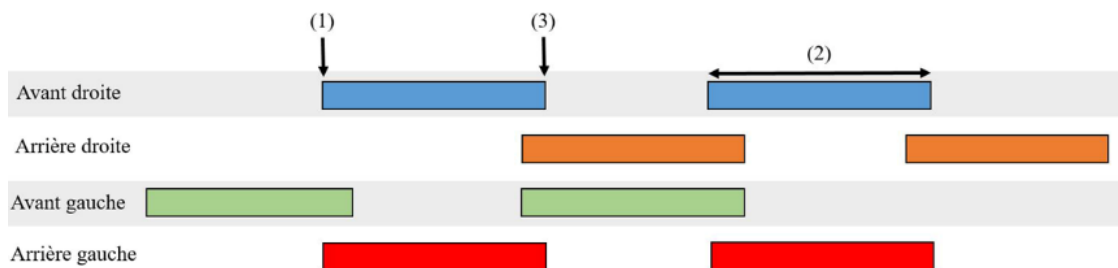


Figure 61: Représentation graphique des patrons locomoteurs. La partie (1) représente le temps où la patte avant droite est détectée sur la plaque en verre. La partie (2) représente le temps pendant lequel la patte avant droite est détectable. La partie (3) représente le temps à partir duquel la patte avant droite n'est plus détectée.

Chacune des pattes est assignée manuellement et le patron locomoteur peut ainsi être évalué.

Définition du patron d'un cycle de pas :

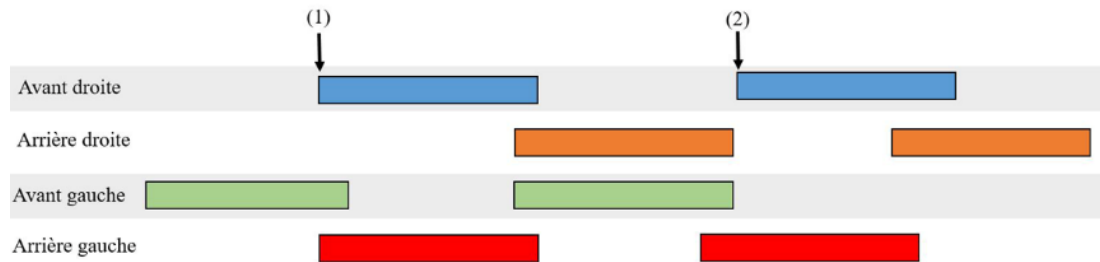


Figure 62 : Patron locomoteur d'un cycle de pas. Dans un cycle de pas, les 4 pattes de l'animal sont détectées. Cela permet d'évaluer le mouvement d'une patte par rapport aux autres et donc de détecter une éventuelle différence dans le patron locomoteur. Le cycle de pas commence au niveau de la partie (1) et finit au niveau de la partie (2).

- « Step cycle » : Représente en secondes le temps entre deux poses initiales consécutives de la même patte.
- « Duty cycle » : Comme la durée de l'appui dépend de la vitesse de marche de l'animal, le "duty cycle" représente le temps de pose des pattes par rapport à la durée totale d'un cycle de pas.
- « Stride length » : Représente la distance en pixels entre deux poses initiales consécutives de la même patte, soit la foulée de l'animal.
- « Max contact » : Représente la durée en secondes de détection maximale d'une patte lors d'un pas. La détection maximale est le nombre maximum de pixels détecté lors de la pose de la patte sur la plaque en verre.
- « Max contact % » : Le paramètre "max contact %" est le temps de contact maximum par rapport au temps de pose de patte lors d'un pas. Ce paramètre correspond donc à la transition entre la phase d'arrêt et de propulsion de la souris.
- « Max area » : Représente l'aire maximale de contact des pattes avant et arrière détectée sur la plaque au moment du « max contact ». Cette valeur est exprimée en pourcentage par rapport à la durée totale du cycle de pas.
- « Regularity index » : Représente une expression du nombre de séquences de pas normales par rapport au nombre total de séquences. L'index de régularité est régulièrement utilisé en recherche sur les lésions de la moelle épinière puisque c'est une mesure de la coordination dans

l'enchaînement de la pose des pattes. Chez un animal non-lésé présentant une bonne coordination, la valeur du « regularity index » est de 100%.

- Angle : Représente une valeur de l'angle de l'axe de la patte par rapport au plan horizontal.

- « Base of support » : Représente la distance moyenne entre les deux pattes avant et entre les deux pattes arrière. La "base of support" est un bon indice de la récupération fonctionnelle puisqu'elle permet d'analyser des potentielles compensations.

L'assignement manuel des pattes a été fait avec le logiciel CatWalk™ (Version 7.1) et les données ont été analysées avec le logiciel « CatMerge » (InnovationNet, France), comme décrit dans de précédentes études (Gerber, 2013). Pour affiner la précision statistique de l'étude comportementale, entre 8 et 10 acquisitions par animal ont été effectuées à chaque temps pré ou post-lésionnel avec un minimum de 5 passages à la même vitesse.

Pour éviter un biais dû au stress, les souris sont habituées au CatWalk™ 7 jours avant la première session d'enregistrement.

2.4.2 Open field

Le suivi de l'activité motrice spontanée est effectué grâce à l'Open field. L'activité motrice spontanée correspond à l'ensemble des mouvements volontaires effectué par l'animal. Le déplacement de l'animal est donc naturel, libre de toute contrainte extérieure. Au moment de la mesure, l'animal ayant suivi une période habituation connaît l'environnement et l'anxiété mesurée dépend de sa condition physiologique et non de la découverte d'un environnement nouveau.

Chaque souris est placée dans une enceinte carrée vide et fermée de 45x45cm et ses déplacements sont enregistrés grâce à une caméra située au-dessus de l'enceinte. L'Open field est composé de 4 enceintes permettant de filmer les déplacements de 4 souris simultanément. Avant chaque analyse, l'enceinte est nettoyée afin d'éviter les biais dus aux odeurs de la souris précédente. Les 4 enceintes sont par ailleurs séparées avec des parois opaques suffisamment hautes pour éviter tout contact entre les souris.

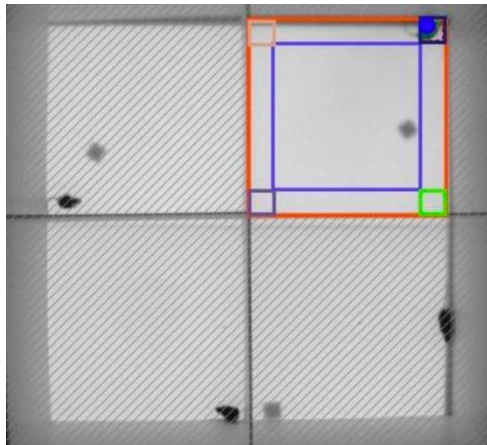


Figure 63 : Dispositif de « l'Open field ». Le système est composé de 4 enceintes fermées de 45x45 cm.

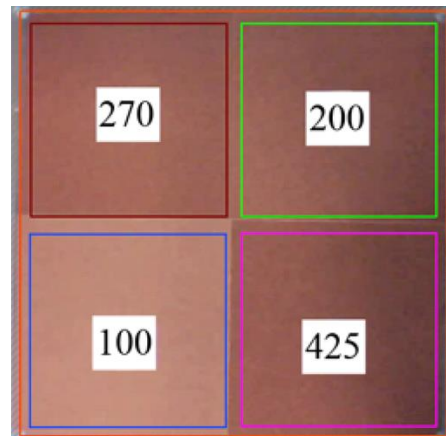


Figure 64 : Une enceinte de « l'openfield » recouverte de papiers de verre de granulosités différentes. Les papiers de verre présentant une densité de grain de 100, 200, 270 et 425 μm .

En plaçant les animaux sur une surface parfaitement lisse, l'activité motrice spontanée est évaluée en analysant plusieurs paramètres tels que la distance parcourue, le temps passé au centre ou en périphérie de l'enceinte, et les temps d'immobilité dans les différentes zones de l'enceinte. Le plus grand carré central bleu représente le centre de l'enceinte tandis que les carrés et rectangles autour représentent la périphérie (Fig. 65).

En plus de l'activité motrice, la sensibilité tactile après une hémisection latérale de la moelle épinière a aussi été évaluée en utilisant du papier de verre placé sur la surface des enceintes (Wetsel, 2007). L'enceinte est divisée en 4 parties égales composées de 4 différentes granulosités de papiers de verre. Les tailles moyennes du grain sont de 100, 200, 270 et 425 μm (Fig. 64).

Paramètres analysés avec les enregistrements Open field :

- « Temps passé dans le carré central » : Représente le temps passé par l'animal dans le carré central par rapport aux autres parties de l'enceinte. Un animal présentant une anxiété restera moins dans le carré central qu'un animal non-anxieux.

- « Immobilité » : Représente le temps pendant lequel l'animal est immobile. Le temps d'immobilité a été défini quand la souris est immobile 2 secondes et plus. Ce paramètre permet d'évaluer une hyperactivité potentielle, ou au contraire, une hyper-anxiété.

- « Temps passé sur le lisse/rugueux » : Représente le temps passé par l'animal sur les parties lisses/rugueuses. Ce paramètre permet d'évaluer la sensibilité tactile des animaux.

Le temps passé, normalisé par la surface de chaque compartiment, sur des papiers de verre lisses et rugueux a été analysé à l'aide « d'EthoTrack » (InnovationNet, France). Chaque acquisition comporte deux enregistrements de 12 minutes. Le premier enregistrement est composé de 2 minutes d'habituation puis 10 minutes sur un terrain lisse, pour évaluer l'activité motrice. Le deuxième enregistrement est composé de deux minutes d'habituation, suivies de 10 minutes sur du papier de verre. Toutes les souris ont été placées dans l'Open field pendant une période de 30 minutes, 7 jours avant la première session d'enregistrement.

2.5 Acquisition IRM

2.5.1 Détermination des paramètres IRM optimaux

Nous avons réalisé des expériences préliminaires afin d'établir les temps de répétition et les temps d'échos optimaux sur l'IRM 9.4T dont nous disposons sur la plateforme. Ce sont les paramètres d'acquisition IRM *in vivo* et *ex vivo* que nous avons ensuite utilisés. Les paramètres d'IRM pondérée en T2 ont été utilisés dans nos publications sur les souris (Noristani et al. 2015; Saint-Martin et al. 2018) et sur petit primate non humain, le *Microcebus murinus* (Le Corre et al. 2017).

2.5.1.1 Valeurs expérimentales T1, T2 et M₀ *ex vivo*

Les propriétés de résonance magnétique *ex vivo* de la moelle épinière ont été obtenues sur notre appareil 9.4T (400MHz). Les valeurs de T1 et T2 de la moelle épinière lésée ont été déterminées en *in vivo* et en *ex vivo*, car la moelle épinière est fixée au paraformaldéhyde 4% pour les études post-mortem, et n'a donc pas les mêmes propriétés. Comme indiqué dans la Partie 2.5.6, nous avons analysé les propriétés IRM de la substance blanche, de la matière grise et du tissu lésé. Nous avons également défini une région d'intérêt (ROI) supplémentaire correspondant au de bruit de fond.

Les relaxations longitudinales ont été mesurées à partir de 6 images pondérées en T1 en utilisant 6 temps de répétition variables (TR) répartis entre 300 et 5000ms. La Figure 65 présente les meilleurs ajustements par la méthode des moindres carrés des données expérimentales par un retour à l'équilibre mono exponentiel (Haacke).

$$SNR_1 = \frac{M0_1}{Bruit_1} \times (1 - \exp(\frac{-TR}{T1}))$$

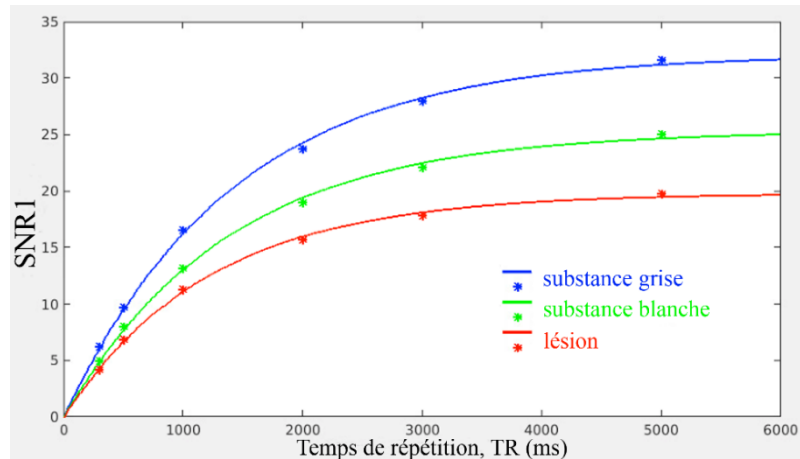


Figure 65 : Données expérimentales (étoiles) et leur ajustement (courbe) du retour à l'équilibre de l'aimantation (séquence d'écho de spin TR variable) des différents tissus de la moelle épinière ex vivo.

Les relaxations transversales ont été mesurées à partir de 15 images pondérées en T2 en utilisant une séquence d'impulsions CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) avec 15 échos séparés par TE=10.45ms (Meiboom and Gill 1958). La Figure 66 présente les meilleurs ajustements des moindres carrés basés sur la décroissance mono exponentielle des données expérimentales.

$$SNR_2 = \frac{M0_2}{Bruit_2} \times \exp\left(\frac{-TE}{T2}\right)$$

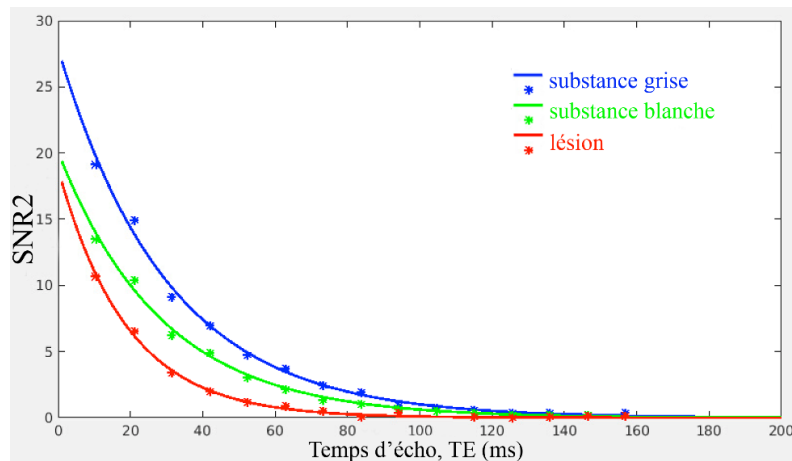


Figure 66 : Données expérimentales (étoile) et leur ajustement (courbe) de la décroissance de l'aimantation (CPMG) des différents tissus de la moelle épinière en IRM ex vivo.

2.5.1.2 Optimisation du temps de répétition en IRM *ex vivo* pondérée en T2

À un champ magnétique élevé (9.4T), les artefacts de mouvement et de susceptibilité magnétique limitent l'utilisation de séquence de type écho de gradient (GEMS) et écho de spin

rapide (FSEMS). Par conséquent, une séquence multi-écho multi-coupe (MEMS) a été choisie pour notre étude. En raison du nombre d'acquisitions à effectuer, le temps de scan pour une moelle épinière a été fixé à 100 minutes.

Pour une durée d'expérience donnée, qui est proportionnelle au temps de répétition, le contraste optimal entre les tissus A et B est donné par :

$$CNR_{opt} = \left| \frac{SNR_{1A} - SNR_{1B}}{\sqrt{TR}} \right| \text{ (Rabenstein 1984)}$$

Dans la Figure 67, les contrastes sont présentés pour les trois régions d'intérêt.

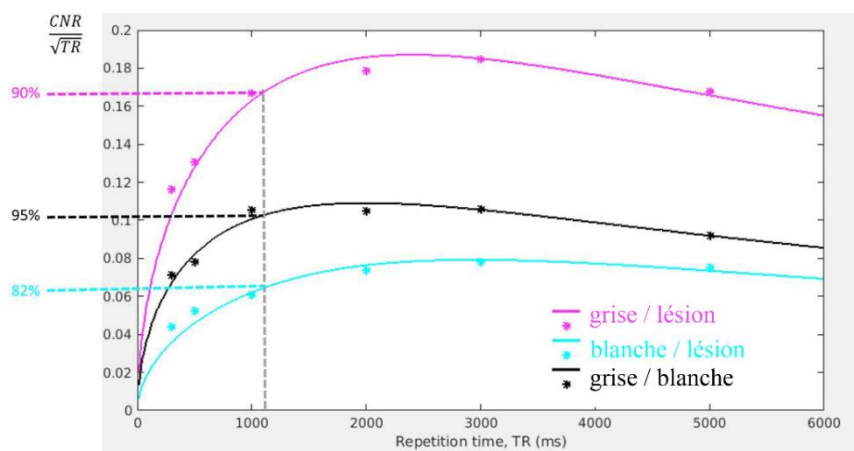


Figure 67 : Contrastes optimaux mesurés (étoile) et modélisés (courbe) entre les régions d'intérêt pour un temps expérimental donné en utilisant les paramètres du Tableau 6.

Comme présenté dans la Figure 67, un bon compromis entre le temps d'acquisition et le contraste pour tous les tissus a été obtenu pour un TR=1155ms, qui donne un CNR de **90%** entre la substance grise et la lésion, **82%** entre la substance blanche et la lésion et **95%** entre la substance grise et la substance blanche.

2.5.1.3 Optimisation du temps d'écho en IRM *ex vivo* pondérée en T2

Le temps d'écho donnant un maximum de contraste est défini par:

$$TE_{cmax} = \ln \left(\frac{M0_{2A} \cdot T2_B}{T2_A \cdot M0_{2B}} \right) \times \frac{T2_A \cdot T2_B}{T2_B - T2_A}$$

Nous avons trouvé que les contrastes optimaux entre les substances grises et blanches et le tissu lésé sont respectivement TE = 0ms et TE = 3.76ms. Ces deux TE sont trop courts pour être implémentés sur l'appareil IRM (Tab. 6).

	TE_{cmax}
--	--------------------------

Grise / Blanche	0 ms
Grise / Lésion	3.76 ms
Blanche / Lésion	19.5 ms

Tableau 4 : Temps d'écho donnant un maximum de contraste entre les régions d'intérêt de la moelle épinière lésée.

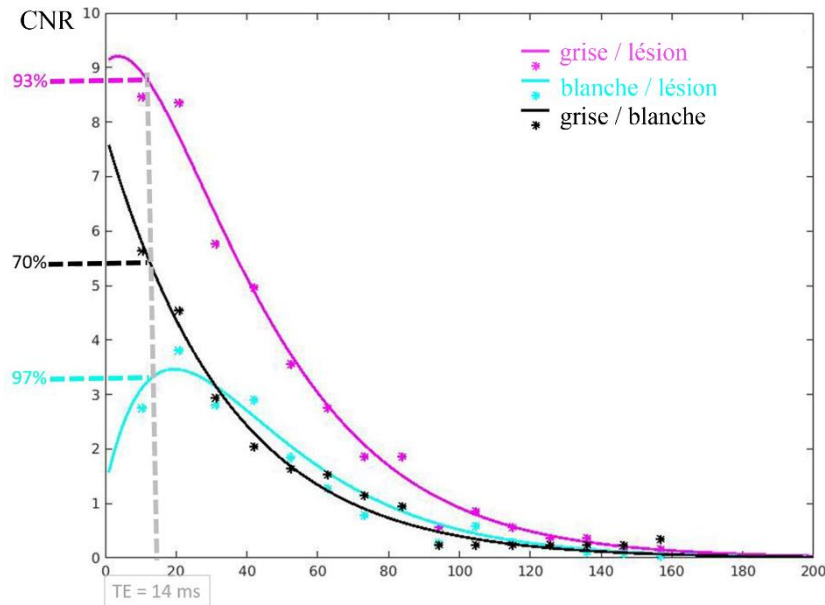


Figure 68 : Contrastes optimaux entre les régions d'intérêt en fonction du TE sélectionné.

Comme présenté dans la Figure 68, un compromis pour obtenir un bon contraste entre toutes les régions a été obtenu avec un TE=14ms, qui donne un CNR de **93%** entre la substance grise et la lésion, **97%** entre la substance blanche et la lésion et **70%** entre la substance grise et la substance blanche.

2.5.1.4 « Gating » ou synchronisation respiratoire en IRM *in vivo*

Les acquisitions d'image sur un animal vivant nécessitent une synchronisation avec le rythme respiratoire afin de limiter les artefacts de mouvement dans la région de la lésion (T9) (2.5.1). Typiquement chez la souris, le rythme est de 30 respirations/min. La qualité des acquisitions est clairement améliorée en recueillant les données seulement pendant le plateau respiratoire d'environ 1200ms entre deux respirations (Fig. 69). Ce plateau permet d'effectuer l'acquisition des 28 coupes en un seul bloc. Un délai supplémentaire de 800 ms dû à la respiration augmente la durée totale de scan à 35 minutes. Le temps de répétition réel de nos acquisitions IRM *in vivo* pondérée en T2 est donc proche de 2000ms. Le TR doit être choisi en prenant en compte

le fait que le signal doit être suffisant pour avoir un CNR fiable, tout en préservant la santé de l'animal en utilisant un temps d'anesthésie raisonnable. Cela est particulièrement vrai dans le cas d'anesthésies répétées nécessaires au suivi longitudinal.

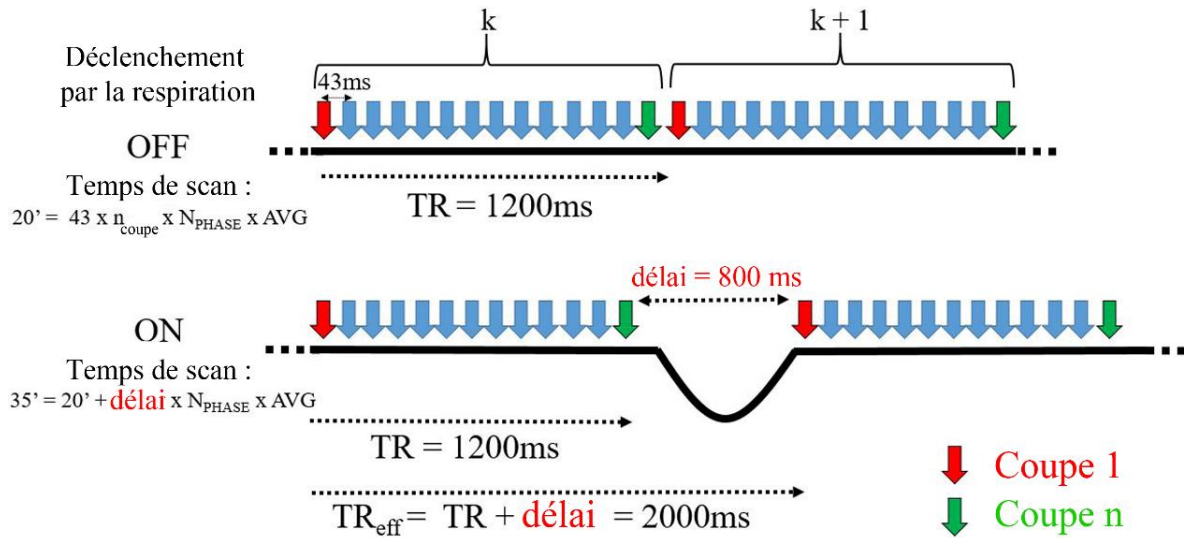


Figure 69 : Illustration du délai causé par le « gating » respiratoire. Le temps TR entre deux applications d'une pulse 90° sur la coupe numéro 1 (flèche rouge) sera de 1200ms lorsque le « gating » respiratoire n'est pas effectué (cas OFF). Lorsque le « gating » respiratoire est effectué (cas ON), le délai causé par l'attente de la fin du plateau respiratoire donnera un TR effectif de 2000ms (Noristani & Saint-Martin, 2018).

2.5.1.5 Valeurs expérimentales T1, T2 et M₀ *in vivo*

Les propriétés de résonance magnétique *in vivo* de la moelle épinière ont été obtenues sur notre appareil 9.4T (400MHz). Nous avons analysé les propriétés IRM de la substance blanche, de la matière grise et du tissu lésé (2.5.6). Nous avons également défini une région d'intérêt (ROI) supplémentaire correspondant au bruit de fond (Fig. 70).

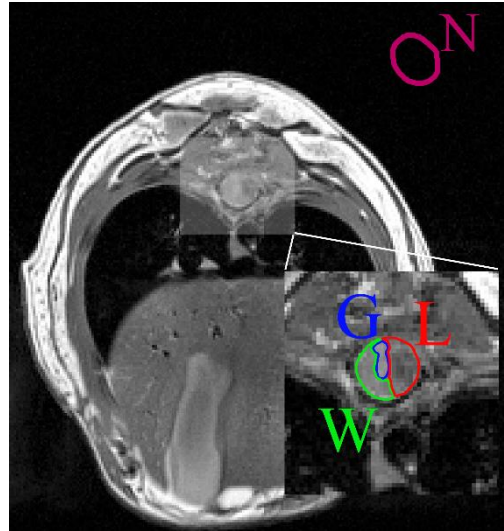


Figure 70 : IRM *in vivo* de la moelle épinière de souris (TR = 1200ms): substance blanche (vert, W), matière grise (bleu, G), lésion (rouge, L) et bruit (violet, N).

Les relaxations longitudinales ont été mesurées à partir de 6 images pondérées en T1 en utilisant 6 temps de répétition variables (TR) répartis entre 300 et 5000ms. La Figure 71 présente les meilleurs ajustements par la méthode des moindres carrés des données expérimentales par un retour à l'équilibre mono exponentiel.

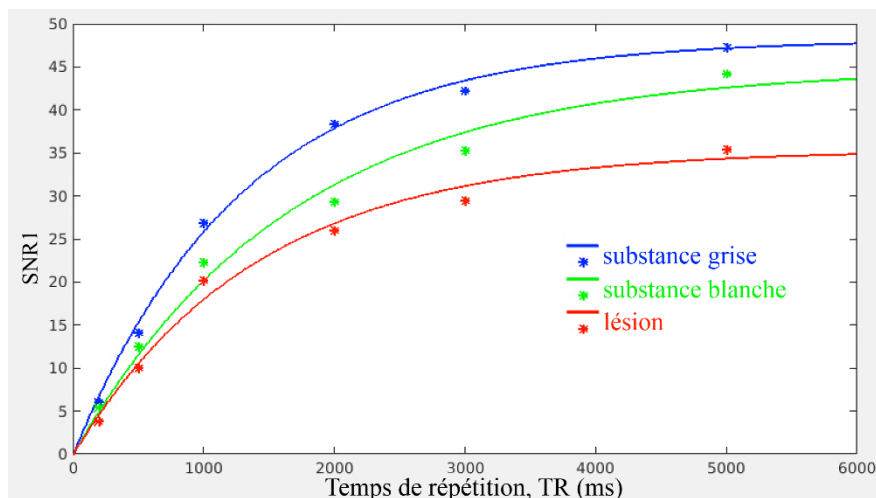


Figure 71 : Données expérimentales (étoiles) et leur ajustement (courbe) du T1 des différents tissus de la moelle épinière *in vivo*.

Les relaxations transversales ont été mesurées à partir de 15 images pondérées en T2 en utilisant une séquence d'impulsions CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) avec 15 échos séparés par TE=9.57ms (Meiboom and Gill 1958). La Figure 72 présente les meilleurs ajustements des moindres carrés basés sur la décroissance mono exponentielle des données expérimentales.

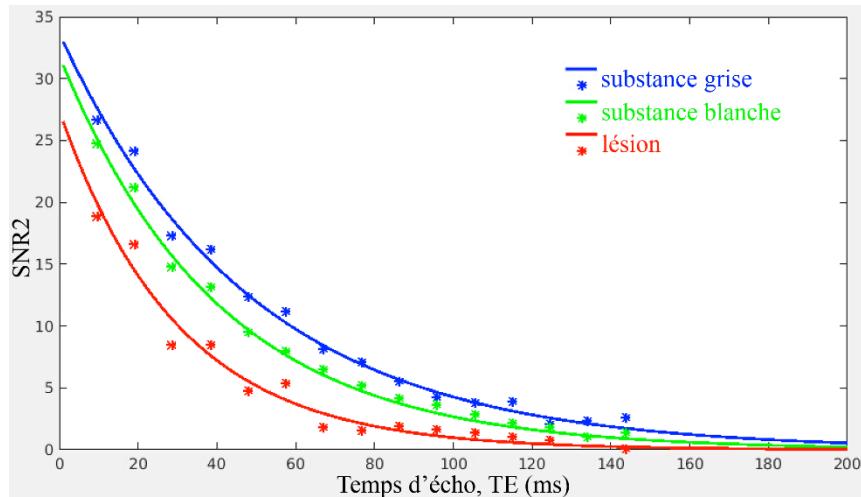


Figure 72 : Données expérimentales (étoile) et leur ajustement (courbe) dépendant des propriétés T2 des différents tissus en IRM *in vivo*.

2.5.1.6 Optimisation du temps de répétition en IRM *in vivo* pondérée en T2

Pour obtenir une identification fiable de la lésion, il est nécessaire de pouvoir la distinguer non seulement des différentes régions de la moelle épinière, mais aussi du reste du corps de l'animal. Il est crucial de faire un compromis avec la sélection du TR pour avoir un bon contraste entre les substances grise et blanche et la lésion, dans un temps d'anesthésie acceptable. En raison de ce temps d'anesthésie, le temps d'acquisition pour imager une souris a été fixé à 40 minutes.

Dans la Figure 73, les contrastes sont présentés pour les trois régions d'intérêt.

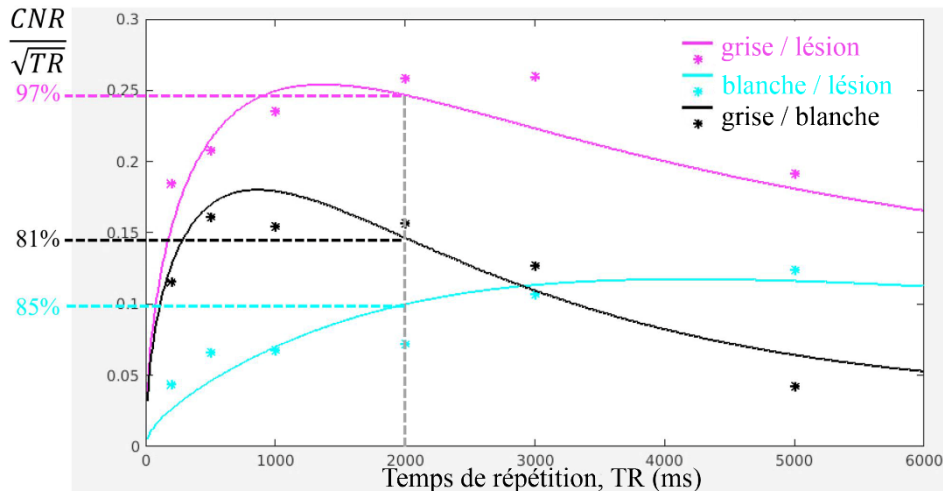


Figure 73 : Contrastes optimaux mesurés (étoile) et modélisés (courbe) entre les régions d'intérêt pour un temps expérimental donné en utilisant les paramètres du Tableau 8.

Comme présenté dans la Figure 73, un bon compromis entre le temps d'acquisition et le contraste pour tous les tissus a été obtenu pour un TR=2000ms, qui donne un CNR de **97%** entre la substance grise et la lésion, **85%** entre la substance blanche et la lésion et **81%** entre la substance grise et la substance blanche.

2.5.1.7 Optimisation du temps d'écho en IRM *in vivo* pondérée en T2

	TE_{cmax}
Grise / Blanche	30.89 ms
Grise / Lésion	21.56 ms
Blanche / Lesion	17.03 ms

Tableau 5 : Temps d'écho donnant un maximum de contraste entre les régions d'intérêt de la moelle épinière lésée.

Notre choix de TE=10ms donne **97%** du contraste théorique maximum entre la substance blanche et la lésion (Fig. 74), qui sont les parties les plus difficile à discriminer, et permet de former 2 échos pour chaque coupe dans un délai raisonnable, au sein du plateau respiratoire de 1200ms.

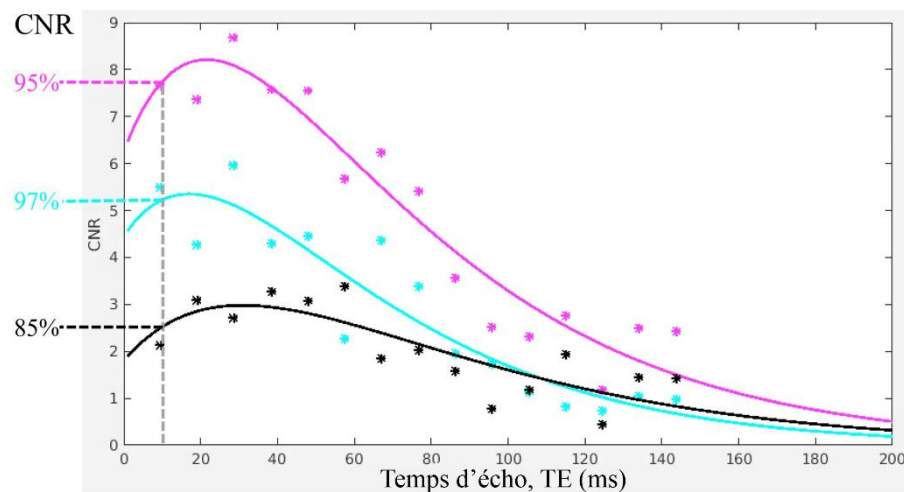


Figure 74 : Contrastes optimaux entre les régions d'intérêt en fonction du TE sélectionné.

Comme présenté dans la Figure 74, un bon contraste entre toutes les régions a été obtenu avec un TE=10ms, qui donne un CNR de **95%** entre la substance grise et la lésion, **97%** entre la substance blanche et la lésion et **85%** entre la substance grise et la substance blanche. Nous aurions pu choisir un TE plus long pour atteindre le maximum, mais étant donné qu'un deuxième écho est effectué, nous avons déjà accès à des images avec un TE=20ms. En pratique, le deuxième écho à TE=20ms n'apporte pas une identification plus aisée du site lésionnel.

2.5.1.8 Paramètres en IRM pondérée en diffusion

a) *Ex vivo*

Facteur *b* :

Le choix de la pondération en diffusion a été fait en prenant en compte les tissus *ex vivo* fixés au paraformaldéhyde 4%, procédure qui est connue pour modifier à la baisse les valeurs d'ADC (Franconi et al. 2000; Matsuzawa, Kwee, and Nakada 1995; Sun, Neil, and Song 2003). Il a donc fallu choisir une pondération de diffusion suffisante pour augmenter les contrastes entre les régions d'intérêt. Nous avons réalisé les expériences préliminaires pour des valeurs de facteur *b* de 500 et 1000 s/mm². Les paramètres renseignés dans le Tableau 9 ont été obtenus à partir de 4 échantillons *ex vivo* provenant de 4 souris lésées. Les mesures ont été effectuées à l'épicentre lésionnel.

Paramètres	b=500 s/mm ²	b=1000 s/mm ²
CNR : Substance grise / Substance blanche	18.43	16.44
CNR : Substance grise / Lésion	30.75	25.69
CNR : Substance blanche / Lésion	12.32	9.25
ADC// : Substance grise (x10 ⁻⁴ mm ² /s)	4.32	4.87
ADC// : Substance blanche (x10 ⁻⁴ mm ² /s)	8.12	8.28
ADC// : Lésion (x10 ⁻⁴ mm ² /s)	8.99	10.74

Tableau 6 : Paramètres obtenus avec des pondérations en diffusion pour différentes valeurs de *b*.

Le facteur *b* fournissant le meilleur contraste entre les zones saines et les zones lésées est 500s/mm². De plus, la pondération à 1000s/mm² provoquait des dysfonctionnements sur la première version de l'antenne dédiée, certainement à cause de l'intensité des gradients de diffusion. Pour ces raisons, nous avons décidé d'appliquer sur toutes nos images *ex vivo* pondérées en diffusion un facteur *b* de 500s/mm². Les ADC// mesurés sont en accord avec les valeurs obtenues par une étude précédente dans un contexte non lésé, avec des valeurs de 5.0 x 10⁻⁴ mm²/s dans la substance grise et de 7.7 x 10⁻⁴ mm²/s dans la substance blanche (Gulani et al. 2001).

Temps de répétition et d'écho :

Le gradient de diffusion diminue le signal dans le plan mais ne le fait pas revenir suivant Z, le problème de TR étant toujours le même. Nous avons décidé de rallonger le TR par rapport à nos précédentes études pondérées en T2, en passant de 1155ms à 1580ms. L'objectif est de recueillir un peu plus de signal en rallongeant le TR, sans augmenter sensiblement le temps d'acquisition. Pour cela, le temps d'acquisition reste de 100 minutes, mais la résolution passe de 256x256 à 128x128. Le temps d'écho de 30.55ms est le plus court possible avec les paramètres choisis, afin de ne pas mélanger l'effet T2 et la pondération en diffusion.

Dans un premier temps, nous avons choisi d'appliquer le gradient de diffusion seulement dans le sens des axones, ce qui permet d'obtenir les meilleurs contrastes entre les régions de la moelle épinière. Nous avons donc fait le choix, par soucis de temps, d'effectuer une séquence pondérée en diffusion (B500), la même séquence sans pondération (B0) et une séquence multi coupes pondérée en T2. Le cumul des trois séquences nécessite 5 heures d'acquisition, et le protocole est effectué sur les 90 échantillons de l'étude. La durée d'acquisition ne permet pas de rajouter deux directions de gradient de diffusion supplémentaires. Le protocole pondéré en diffusion permet donc de mesurer avec le volume lésionnel, et d'obtenir le coefficient de diffusion parallèle aux axones.

b) *In vivo*

Facteur b :

Le facteur b choisi est proche de celui de l'IRM *ex vivo* afin de reproduire des pondérations similaires, très satisfaisantes. La pondération en diffusion devait être suffisante pour augmenter les contrastes entre les régions d'intérêt, mais sans artéfacter l'image à cause du LCR présent autour de la moelle épinière, et des os, qui ont un effet de susceptibilité assez important. Pour toutes ces raisons, nous avons décidé d'appliquer sur toutes nos images pondérées en diffusion en *ex vivo* un facteur b de 565s/mm² dans le sens du gradient de lecture, et de 500s/mm² dans le sens des gradients de lecture et de phase.

Temps de répétition et d'écho:

Comme en IRM *in vivo* pondérée en T2, il y a un décalage entre le temps de répétition choisis pour faire l'acquisition des coupes dans un plateau respiratoire, et le temps de répétition réel. En effet, en plus du gating respiratoire, nous avons inclus un gating cardiaque afin de diminuer les artefacts de mouvement et d'améliorer la qualité des images.

Ce monitoring cardiaque entraîne donc un délai supplémentaire, qui allonge encore le TR effectif. Nous avons choisi $TR=5000ms$ afin de s'assurer de ne pas être pondéré T1. A posteriori, nous avons pu estimer un TR effectif autour de $10000ms$ pour le protocole *in vivo* « classique » et de $5000ms$ pour le protocole *in vivo* « optimisé ». Le temps d'écho de $23.96ms$ est le plus court possible avec les paramètres choisis, afin de ne pas mélanger l'effet T2 et la pondération en diffusion.

2.5.2 Protocole IRM pondérée T2 *in vivo*

Le nombre d'animaux utilisés pour l'IRM *in vivo* pondérée T2, ainsi que les temps d'analyse choisis sont répertoriés dans le Tableau 1 (2.1).

Les acquisitions d'IRM sont réalisées en utilisant un appareil 9.4 Tesla (Agilent Varian 9.4 / 160 / ASR, Santa Clara, Californie, USA) équipé d'un MAGNEX TS1276D, une antenne volumique en quadrature 400MHz RF43 (43mm de diamètre interne, Rapid Biomedical, Rimpar, Allemagne) et associé à un système d'acquisition VnmrJ Imaging (Agilent, Palo Alto, Californie, USA).



Figure 75: IRM 9.4 Tesla de la plateforme BioNanoMRI. Le champ magnétique de l'IRM 9.4T est environ 200 000 fois supérieur au champ magnétique terrestre.

Les souris sont anesthésiées (1,5% d'isoflurane, litre / minute d'O₂) en utilisant un équipement d'anesthésie compatible avec la résonance magnétique (amagnétique) et un système de support d'animal (Minerve Siemens A.G., Erlangen, Allemagne) / RS2D (Haguenau, France). La respiration et la température corporelle sont monitorées en continu à l'aide du système de surveillance et de déclenchement pour petits animaux (modèle 1025, SA Instruments, Inc., New York, États-Unis). La respiration est maintenue autour de 30-35 respirations / minute en ajustant le niveau d'isoflurane et le débit d'oxygène.



Figure 75 : Mise en place d'une souris dans le banc d'anesthésie. Le banc d'anesthésie permet de mesurer la température, la fréquence cardiaque et la fréquence respiratoire (Minerve Siemens)

Les images en orientation transversale sont obtenues avec un protocole de séquence multi coupe écho de spin pondérée T2 (MEMS, Multiple Echo Multi Slices) en utilisant les paramètres suivants : TR = 2000ms; TE = 10ms; NE = 2; AVG = 4; FOV = 30x30mm; 28 coupes; Thickness = 0.6mm; Gap = 0mm; matrix ($N_{\text{READ}} * N_{\text{PHASE}}$) = 256x256. Toutes les acquisitions d'images ont été synchronisées avec la respiration pour réduire les artefacts de mouvement, le temps de répétition dépendant donc de la période de respiration (T_{BREATHE}), typiquement d'environ 2 secondes. Par conséquent, le temps de scan pour l'acquisition d'image transversale est d'environ 35 minutes ($T_{\text{BREATHE}} * N_{\text{PHASE}} * \text{AVG}$).

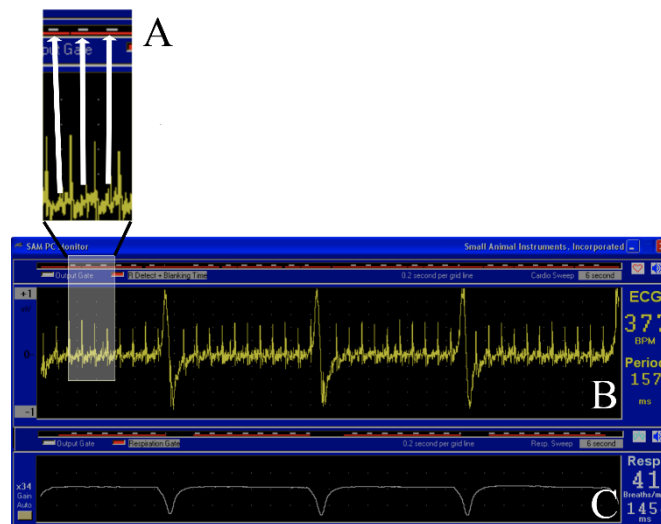


Figure 76 : Synchronisation des acquisitions avec les rythmes respiratoires et cardiaques. Les acquisitions sont effectuées entre deux battements cardiaques (B) et entre deux plateaux respiratoires (C). Le zoom (A) de l'ECG permet de visualiser les points d'acquisti

Les images en orientation sagittale sont également obtenues avec un protocole multi coupe en utilisant les paramètres suivants : TR = 2000ms; TE = 10ms; NE = 2; AVG = 2; FOV = 40x30mm; 10 coupes, Thk = 0.6mm; Gap = 0mm; matrice d'acquisition = 256x256. Le temps

de scan pour l'acquisition de l'image sagittale est d'environ 15 minutes. Toutes les visualisations et segmentations IRM sont réalisées à l'aide du logiciel Myrian (Intrasense, Montpellier, France). Les tissus intacts (moelle épinière entière, substances blanches et grises) et les tissus endommagés sont détournés manuellement.

2.5.3 Protocole IRM pondérée T2 *ex vivo*

Six semaines après la chirurgie, les souris lésées (et les souris contrôles non-lésées) qui ont été suivies en analyse longitudinale par IRM *in vivo* pondérée T2 sont profondément anesthésiées puis perfusées au paraformaldéhyde (2.3). Les moelles épinières sont disséquées et les tissus sont préparés pour l'analyse IRM *ex vivo*. Afin d'améliorer le contraste entre le tissu et le bruit, les moelles épinières sont incubées dans du gadolinium (1:100 dans du PBS 0.1M, Dotarem, 0.5mmol/mL, Guerbet, Roissy CdG, France) pendant 48 heures. En effet, le gadolinium a pour effet de faire chuter le temps de relaxation des tissus et donc les temps T1 et T2 des tissus sont plus courts. Juste avant l'acquisition d'IRM *ex vivo*, les moelles épinières sont placées dans un tube en verre de 5mm de diamètre rempli de Fluorinert FC-77 (3M™ Electronic Liquids, Saint Paul, USA). Le Fluorinert est un fluide sans protons qui présente une faible solubilité dans l'eau et une susceptibilité similaire au tissu, ce qui réduit considérablement le bruit de fond pendant l'acquisition de l'image. Le tube est ensuite placé dans l'appareil de 9.4 Tesla pour l'acquisition en utilisant l'antenne volumique en quadrature 400MHz RF43, antenne usuellement utilisée pour les acquisitions *in vivo*.

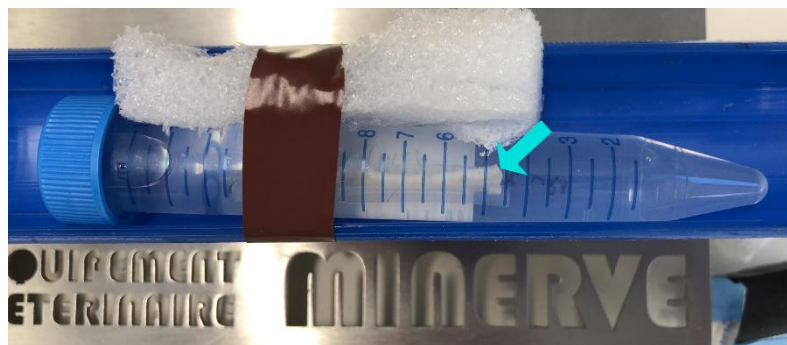


Figure 77 : Positionnement de la moelle épinière (flèche bleue) dans un tube en silicone avant d'être placé dans l'antenne RF43.

Les images transversales sont obtenues avec des séquences T2 de spin-écho (protocole MEMS) en utilisant les paramètres suivants : TR = 1155ms; TE = 14ms; NE = 1; AVG = 180; FOV = 10x10mm; 60 coupes, Thk = 0.6 mm; Gap = 0mm; matrix = 256x256. Le nombre de moyennes

(AVG) a été déterminé pour satisfaire au critère de Rose, c'est-à-dire que le ratio signal sur bruit soit bien supérieur à 5 (Rose, 1948). Le temps de scan pour l'acquisition *ex vivo* est d'environ 15 heures. Comme pour les acquisitions *in vivo*, toutes les analyses sont réalisées à l'aide du logiciel Myrian et les différentes zones lésées et préservées du tissu sont segmentées manuellement.

2.5.4 Protocole IRM pondérée diffusion *ex vivo*

Le nombre d'animaux utilisés pour l'IRM *ex vivo* pondérée diffusion, ainsi que les temps d'analyse choisis sont présentés dans le Tableau 1 (2.1).

Un groupe supplémentaire de souris femelles lésées Aldh111 et CX3CR1 est analysé longitudinalement en IRM *ex vivo* avec des images pondérées diffusion. Dans cette partie de l'étude, le développement par la plateforme BioNanoMRI d'une antenne dédiée à l'étude des lésions de la moelle épinière permet de grandes améliorations en termes de signal sur bruit.

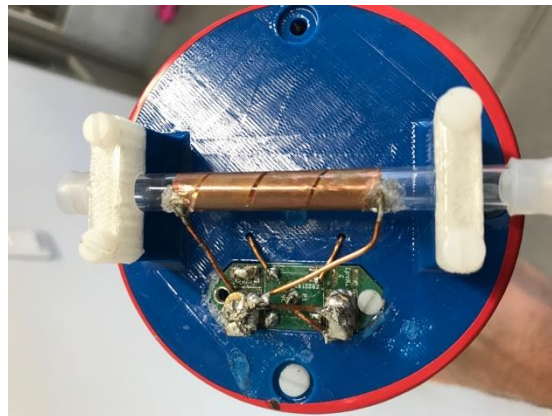


Figure 79 : Antenne dédiée à l'étude des lésions de la moelle épinière. La bobine solénoïde permet une proximité optimale avec l'objet d'intérêt.

Les tissus sont introduits dans le tube de verre de 4mm de diamètre de l'antenne rempli de Fluorinert jusqu'à être positionné au centre de la bobine solénoïde (Fig. 79) et imagés en utilisant le même appareil 9.4 Tesla décrit précédemment. Les paramètres d'acquisition suivants ont été utilisés : multi-echo multi-slices (MEMS); TR = 1155ms, TE = 14ms, NE = 1, AVG = 20, FOV = 10x10mm, 60 coupes, Thk = 0.6mm, Gap = 0, matrix = 256x256. Le temps de scan était d'environ environ 60 minutes. Les images transversales de diffusion ont été acquises à l'aide de deux protocoles séquentiels pondérés diffusion spin echo multi-slices (SEMS-dw).

Les paramètres de diffusion suivants ont été utilisés :

- $G_s = 10\text{G/cm-1}$
- $\Delta = 6.88\text{ms}$,
- $\text{Séparation} = 15.05\text{ms}$
- $\text{Facteur } b = 499.21\text{s/mm}^2$

Les paramètres d'acquisition suivants ont été utilisés :

TR = 1580ms, TE = 30.55ms, AVG = 30, FOV = 10x10mm, 36 coupes, Thk = 1mm, Gap = 0 et matrice d'acquisition = 128x128mm, temps de scan : environ 100 minutes. Pour la deuxième séquence, les paramètres ont été répétés mais sans gradient de diffusion appliqué sur l'axe longitudinal ($G_s = 0$, facteur $b \approx 0$). Temps de scan : environ 100 minutes. Les images sont exportées au format DICOM et traitées à l'aide d'un protocole développé par la plateforme sur MATLAB.

2.5.5 Protocole IRM pondérée diffusion *in vivo*

Des souris femelles lésées Aldh111 et CX3CR1 sont analysées longitudinalement *in vivo* mais avec des images pondérées diffusion. La principale différence avec les acquisitions *in vivo* en IRM pondérée en T2 réside dans le fait que toutes les acquisitions d'images sont synchronisées avec la respiration et le rythme cardiaque pour réduire les artefacts de mouvement. En effet, les images étant plus sensible aux artefacts de mouvement en présence de gradient de diffusion, les acquisitions ont été déclenchées dans un plateau respiratoire entre deux battements cardiaques. Par conséquent, le temps de scan pour l'acquisition d'image transversale était d'environ 45 minutes. Des images transversales ont été obtenues en utilisant un protocole écho de spin multi coupes pondéré diffusion (SEMSdw) avec les paramètres suivant : TR = 10000ms ; TE = 23.96ms ; AVG = 1 ; FOV = 40x40mm ; 20 coupes ; Thk = 1mm ; Gap = 0mm ; matrix= 192x192.

Les paramètres de diffusion suivants ont été utilisés :

- $G = 20\text{G/cm}$
- $\Delta = 4 \text{ ms}$
- $\text{Séparation} = 12.15 \text{ ms}$
- $B\text{-value} = 565\text{s/mm}^2$

Une seule séquence a été effectuée et le choix d'appliquer le gradient de diffusion seulement le long de l'axe de la moelle épinière (dans le sens du gradient de sélection) est justifié par le temps d'acquisition qui ne devait pas excéder une heure dans le cadre d'un suivi longitudinal qui nécessite des anesthésies répétées. La séquence dure en moyenne 37 minutes, et afin de

respecter un temps d'anesthésie assez court, aucune autre séquence n'est acquise. Il n'est donc pas possible de calculer les coefficients de diffusion avec ce protocole. Il aurait fallu au minimum une séquence supplémentaire de 37 minutes avec un facteur b nul, ce qui n'est pas compatible avec un suivi longitudinal *in vivo*. Quelques images sagittales ont aussi été obtenues en utilisant les paramètres suivant : TR= 5000ms ; TE= 25.34ms ; AVG= 1 ; FOV=60x30mm ; 10 coupes ; Thk = 0.5mm ; Gap = 0mm ; Résolution = 256x128; Paramètres de diffusion : le gradient de diffusion a été appliqué le long de la moelle épinière, dans le sens du gradient de lecture, $G_s = 20\text{G/cm}$; Delta = 4ms ; Séparation = 12.15ms ; facteur b= 500.98s/mm². Les mêmes images sur quelques animaux contrôle ont été obtenues sans appliquer de gradient de diffusion ($G_s = 0\text{G/cm}^{-1}$) afin d'illustrer la différence entre les images sagittales obtenues avec une pondération diffusion (facteur b=500 s/mm²) et sans (facteur b=0 s/mm²) (3.8.1).

2.5.6 « Dicomisation » et traitement des images

Un protocole Matlab a été mis au point afin de procéder à la conversion des données au format DICOM, qui est le format compatible à l'analyse sur le logiciel Myrian (Intrasense, Montpellier, France). Lors de cette conversion, un "zero filling" est effectué sur les images brutes afin de passer à une résolution supérieure sur les images à analyser.

2.5.7 Evaluation de la qualité du signal

Pour analyser la qualité du signal, nous avons calculé pour les différentes modalités le rapport signal sur bruit, ainsi que le rapport contraste sur bruit. En effet, pour qu'une image IRM soit utilisable, et que les mesures effectuées sur cette image soient valables, on dit qu'elle doit satisfaire au critère de Rose. Elle doit en effet afficher un signal, c'est-à-dire la zone d'intérêt de l'image, 5 fois supérieur au bruit, qui est le fond de l'image (Rose 1948).

a) Rapport signal sur bruit

Le rapport signal sur bruit (SNR) est utilisé pour évaluer la qualité de l'image, il est un indicateur de la qualité de transmission d'une information, ici du signal. Il correspond à la valeur de signal mesurée d'une zone d'intérêt divisée par le bruit de fond.

$$SNR = \frac{Signal}{Bruit} = \frac{Zone\ d'intérêt}{Fond\ de\ l'image}$$

Pour calculer le rapport signal sur bruit, les différentes zones d'intérêt sont identifiées : la substance grise, la substance blanche, la zone lésionnelle et le bruit de fond de l'image. L'intensité du signal possède une valeur numérique et on obtient cette valeur en mesurant l'intensité des pixels dans des régions d'intérêt et du bruit sur les images obtenues (Fig. 78).

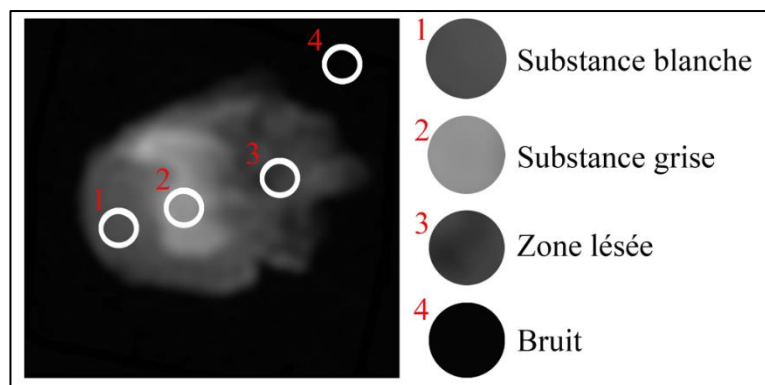


Figure 78 : Définition des régions d'intérêts pour mesurer le SNR de l'image. L'intensité de signal de la substance blanche (1), la substance grise (2), la zone lésée (3) et le bruit de fond de l'image (4) est mesurée.

Par exemple :

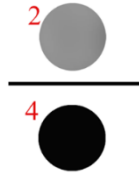


Figure 79 : Illustration du calcul de SNR de la substance grise. L'intensité du signal de la région de la substance grise est divisée par l'intensité du bruit de fond de l'image.

b) Rapport contraste sur bruit

Le rapport contraste sur bruit est assez similaire au signal sur bruit, mais il prend en compte la différence d'intensité de signal entre différentes régions de l'objet imagé, différence qui est ensuite divisée par le bruit.

$$CNR = \frac{\text{Signal zone 1} - \text{Signal zone 2}}{\text{Bruit}} = \frac{\text{Zone d'intérêt 1} - \text{Zone d'intérêt 2}}{\text{Fond de l'image}}$$

Le rapport contraste sur bruit est une valeur primordiale pour évaluer la qualité de l'image. En effet, même si le SNR est très bon, l'image ne peut apporter aucune information si le contraste entre les différentes régions n'est pas bon. Ainsi, dans le cadre de l'étude de lésion de la moelle épinière, si l'intensité du signal de la moelle épinière est très élevée mais qu'il est impossible de discriminer les parties préservées des parties lésées, l'image sera inutilisable et un haut SNR sera donc inutile (Fig. 80).



Figure 80 : Illustration d'une moelle épinière avec un très haut SNR. Le SNR est grand puisque l'intensité du signal de la moelle épinière est très élevée par rapport à l'intensité du bruit de fond mais cette image ne permet pas de discriminer la substance grise de la substance blanche.

Le contraste sur bruit donne une valeur indiquant la facilité de discriminer deux régions distinctes. En effet, il est plus facile de discriminer deux régions quand l'intensité de leurs signaux est très différente, et donc que la valeur de contraste sur bruit est élevée.

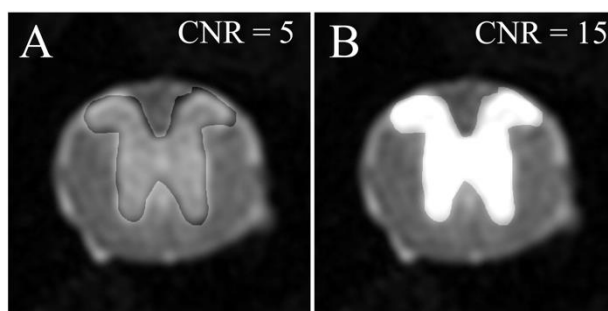


Figure 81 : Illustration d'une image avec un CNR moyen (CNR=5) et un CNR élevé (CNR=15). Entre les images (A) et (B), l'intensité du bruit et du signal de la substance blanche sont les mêmes, seul le signal de la substance grise diffère. Le contraste sur bruit entre la substance blanche et la substance grise est bien supérieur à (B).

2.6 Etude histochimique

A la suite de l'acquisition IRM *ex vivo*, les tissus sont congelés puis coupés au cryostat en coupes transversales de 14 μ m d'épaisseur (2.3.3).

2.6.1 Marquage bleu de toluidine

Le marquage au bleu de toluidine interagit avec les structures basophiles subcellulaires tels que les organites riches en acides nucléiques : les ribosomes, le noyau, le réticulum endoplasmique granuleux. En microscopie photonique, ce marquage met en évidence les noyaux des cellules. Il a donc été utilisé dans une analyse globale de l'intégrité tissulaire visant à évaluer l'intégrité générale de la moelle épinière, et à estimer l'extension de la lésion.

Les coupes transversales de moelle épinières ont été rincées 2 fois dans du PBS 0.1M, placées dans du bleu de toluidine à 1% (dilué dans de l'éthanol 70%) pendant 10 minutes à température ambiante, puis déshydratées dans de l'éthanol 100% pendant 10 secondes. La déshydratation élimine l'eau des échantillons et assure une bonne conservation des coupes. Deux rinçages au xylène ont ensuite été effectués, avant de monter les coupes entre lame et lamelle dans du milieu de montage Entellan (Merck KGaA, Allemagne). Les images des marquages sont obtenues avec un scanner de lame NanoZoomer RS et leur analyse est effectuée avec le logiciel NDP view (NanoZoomer Digital Pathology System Hamamatsu, Japon). Le site lésionnel est facilement identifiable par l'accumulation de cellules positives au bleu de toluidine autour des zones endommagées, ainsi que la désorganisation histologique de la moelle épinière. En effet, les zones de la substance grise et de la substance blanche ne sont plus différenciables dans un contexte lésionnel (Fig. 82).

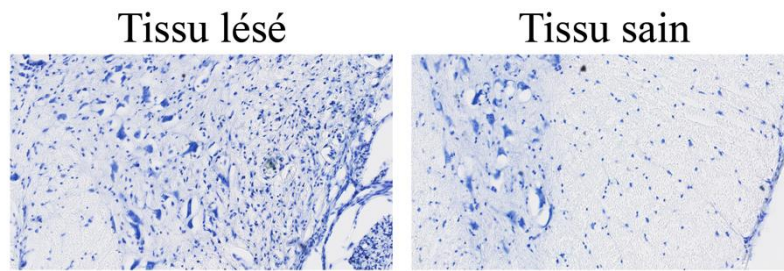


Figure 82 : Marquage au bleu de toluidine. L'accumulation de cellules positives et la désorganisation histologique de la moelle épinière dans un contexte lésé permettent de détecter le site lésionnel, au contraire d'un contexte sain.

Afin de déterminer l'extension et le volume de la lésion, au minimum 20 coupes par souris ont été analysées tous les 630µm sur un segment total de 1.3cm centré sur l'épicentre de la lésion. Les surfaces de tissu lésé, mais aussi les surfaces de la substance grise et de la substance blanche préservées sont mesurées. A partir de ces valeurs, l'extension de la lésion est déterminée selon l'axe rostro-caudal. Les résultats de l'analyse de la lésion avec le marquage au bleu de toluidine sont présentés comme pour l'IRM (2.10).

2.6.2 Immunohistochimie

a) Caractérisation des anticorps

L'usage de tous les anticorps primaires a été validé précédemment chez la souris.

Les anticorps primaires utilisés :

- Lapin anti-GFAP (Dako, Glostrup, Danemark, dilution: 1:500, Cat # Z 0334, RRID: AB_10013382)
- Lapin anti-IBA1 (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan; dilution: 1:200; Cat# 019-19741; RRID: AB_839504)
- Chèvre anti-5-hydroxytryptamine (Immunostar, Hudson, USA; dilution: 1:1000; Cat# 20079; RRID: AB_572262)
- Lapin anti 5-hydroxytryptamine transporter (SERT) (Immunostar, Hudson, USA; dilution: 1: 1000; Cat# 24330; RRID: AB_572209)

b) Protocole d'immunohistochimie

Les protocoles d'immunohistochimie consistent à marquer une protéine d'intérêt potentiellement exprimée par les cellules étudiées. Ainsi, le marquage anti-GFAP révèle la présence de la protéine glial fibrillary acidic protein (GFAP) exprimée par les astrocytes. Le marquage anti-IBA1 permet de marquer la protéine Ionized calcium binding adaptator molecule

1 (IBA1), qui est synthétisée par les cellules de la lignée myéloïdes dont les microglies. Le marquage anti-5HT détecte la sérotonine, un neurotransmetteur, et le marquage anti-SERT identifie le transporteur de la sérotonine (SERT), une protéine transférant la sérotonine de la fente synaptique à la pré-synapse.

c) Péroxydase

L'objectif de la révélation d'un marquage immunohistochimique avec la peroxydase est de visualiser le signal obtenu en fixant sur l'anticorps primaire un anticorps secondaire spécifique couplé à l'enzyme peroxydase (Fig. 83).

L'activité enzymatique de cette dernière peut générer un précipité marron colorant la cellule lorsqu'elle est mise en contact avec un substrat chromogène, la diaminobenzidine (DAB). L'anticorps primaire ciblant spécifiquement la protéine d'intérêt, la réaction finale observée en microscopie photonique sera représentative de l'expression de la protéine d'intérêt.

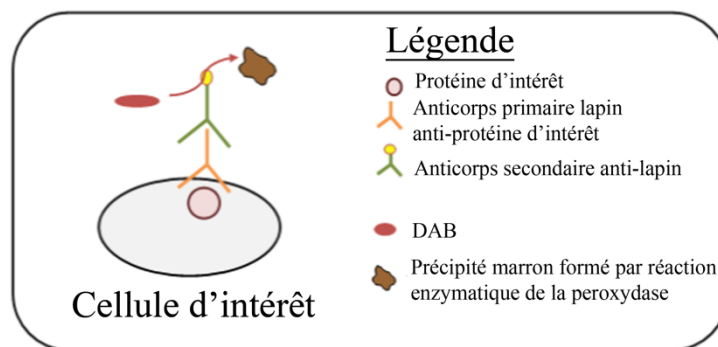


Figure 83 : Illustration d'un marquage peroxydase

Une fois décongelées à température ambiante, les lames sont chauffées pour favoriser l'adhérence des coupes sur les lames. Après 3 rinçages de 10 minutes avec du PBS 0.1M visant à éliminer les résidus d'O.C.T (Optimum Cutting Temperature), les lames sont exposées à une solution de H₂O₂ (Sigma Aldrich) à 3% pendant 30 minutes. L'eau oxygénée étant un catalyseur de la peroxydase, ce composé chimique sature les peroxydases endogènes et garantit de la spécificité du signal obtenu avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase exogène. Après 2 nouveaux rinçages de 10 minutes avec du PBS 0.1M, les tissus sont exposés à la solution de blocage composée de BSA 1% (Bovine Serum Albumine, Sigma Aldrich) et de Triton 0.1% (Sigma Aldrich) pendant au moins 2 heures. Dans cette étape, le détergent Triton, perméabilise les membranes plasmiques pour permettre aux anticorps d'atteindre leurs cibles cytoplasmiques. L'albumine du sérum se fixe sur le tissu afin de saturer les sites de liaison non spécifiques aux anticorps utilisés. Les lames sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire,

dilué avec la solution de blocage, pendant 48 heures à 4°C. Les lames sont ensuite rincées au PBS 0.1M pendant 30 minutes puis exposées à l'anticorps secondaire correspondant (Jackson Immunoresearch, Stratech Scientific Ltd, Soham, Royaume-Uni) pendant 2 heures à température ambiante. Les lames sont rincées au PBS 0.1M et la réaction de la peroxydation a été visualisée en baignant les tissus dans une solution contenant 0.022% de 3,3'diaminobenzidine (DAB, Aldrich, Gilligham, Royaume-Uni) et 0.003% H₂O₂ pendant 20-30 minutes. La réaction est ensuite arrêtée par un rinçage avec du PBS 0.1M. Les lames sont déshydratées par des bains à concentrations croissantes d'éthanol (50, 70, 80, 90, 95 and 100%) et par un dernier bain dans du xylène. Les coupes sont montées entre lames et lamelles dans de l'Entellan (Merck KGaA, Allemagne) et laissées à sécher pendant une nuit. Pour garantir la spécificité de la réaction, des témoins négatifs sont utilisés dans lesquels l'anticorps primaire a été omis.

d) Fluorescence

Le principe du marquage par fluorescence est le même que pour un marquage peroxydase, à l'exception que la coloration finale ne sera le produit d'une réaction enzymatique mais l'émission d'un rayonnement lumineux issu d'un fluorochrome (Fig. 84). En effet, l'anticorps secondaire est couplé à un fluorochrome qui, lorsqu'il est irradié par un rayonnement dont la longueur d'onde provoque son excitation, émet un signal monochromatique observable au microscope à épifluorescence ou au microscope confocal.

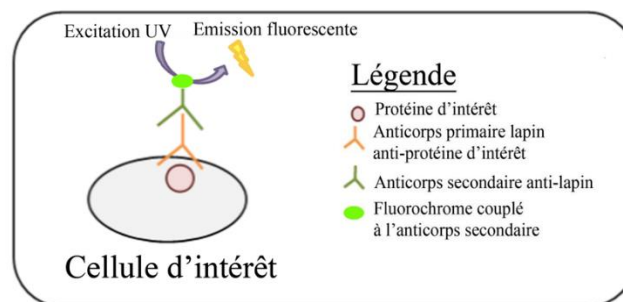


Figure 84 : Illustration d'un marquage avec un fluorochrome

Pour l'immunofluorescence, les sections sont d'abord incubées avec l'anticorps primaire comme décrit dans la partie peroxydase, puis avec les anticorps secondaires conjugués aux fluorochromes Alexa 488 ou Alexa 594 (Vector Laboratories, Burlingame, Etats-Unis et Millipore Bioscience Research Re-agents, Massachusetts, Etats-Unis). Les marquages sont observés par microscopie confocale à balayage laser (Zeiss 5 Live Duo, Oberkochen, Allemagne).

2.6.3 Analyse de l'immunohistochimie

Pour l'analyse quantitative des marquages immunohistochimique à la peroxydase, jusqu'à 20 coupes par souris ont été réalisés à des intervalles de 630 μ m sur un segment de 1.3cm de la moelle épinière centré sur l'épicentre de la lésion. Le marquage des protéines est ensuite quantifié par densité optique. La mesure de la densité optique renseigne donc sur le niveau d'expression de la protéine dans diverses conditions expérimentales et dans les diverses régions de la moelle épinière. Les intensités de coloration de GFAP, IBA1 et SERT ont été évaluées en mesurant leur densité optique relative (DO) en utilisant ImageJ (National Institutes of Health, Etats-Unis).

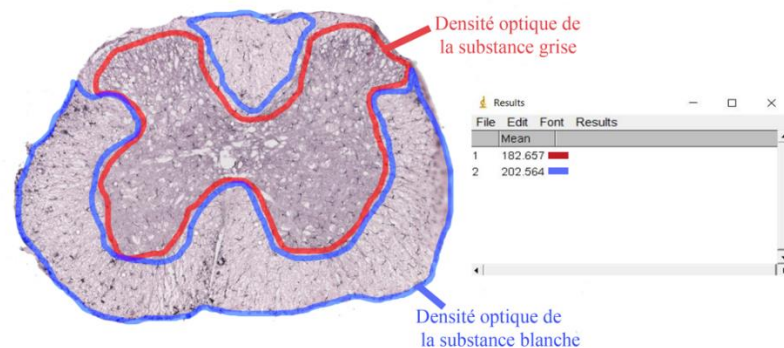


Figure 85 : Illustration de la mesure de la densité optique après un marquage IBA1. La mesure indiquée dans le tableau indique la densité optique de la substance grise (rouge, unité arbitraire (UA)) et de la substance blanche (bleu, UA).

Pour les souris contrôles non-lésées, le segment équivalent de la moelle épinière est analysé. Six temps post-lésionnels sont évalués au niveau histologique, 24 et 72 heures, 1, 2, 4 et 6 semaines (3-8 souris par groupe). Les analyses sont effectuées en aveugle. Pour déterminer les changements induits par la lésion dans l'expression de la protéine, la DO moyenne est mesurée à différentes distances du site lésionnel. Pour éviter une variation potentielle de l'intensité de la coloration entre différentes lames, pour une protéine donnée, les marquages de tous les animaux sont effectués en même temps. Les coupes de la moelle épinière sont imagées à l'aide d'un scanner Nanozoomer RS qui utilise une lumière constante et un temps d'exposition constant pour obtenir des photographies (NanoZoomer Digital Pathology System et NDP View Hamamatsu, Japon). Les images numériques sont exportées au format RGB en utilisant des paramètres d'analyse et d'export identiques pour toutes les sections. Le bruit de fond non spécifique est déterminé pour chaque section et sa valeur a été soustraite à la densité optique de la zone d'intérêt, telle que la substance blanche, la substance grise et la zone lésée. L'épicentre

de la lésion est clairement différentiable des zones préservées après un immunomarquage peroxydase.

2.7 Déplétion de la microglie

Pour mieux comprendre le rôle des microglies dans un contexte lésionnel, une inhibition transitoire de la prolifération microgliale par la molécule GW2580 a été entreprise. Les animaux ont été traités *per os* au GW2580 (150mg/kg/jour) avant d'effectuer la lésion afin de démontrer un effet de la molécule. Tout au long du traitement, le statut physiopathologique des animaux a été évalué sur le plan comportemental, en IRM *in vivo* pondérée en diffusion, en IRM *ex vivo* pondérée en diffusion et finalement par des techniques immunohistochimiques.

2.7.1 Injection de BrdU

Pour évaluer l'effet de GW2580 sur la prolifération des microglies / monocytes chez des souris lésées et non lésées à la moelle épinière, du bromodesoxyuridine (BrdU) dissout dans une solution saline stérile est quotidiennement administré à un groupe d'animaux supplémentaire (i.p., 100 mg/kg, Sigma Aldrich, Gilligham, UK) juste après la chirurgie et pendant 1 semaine (Fig. 86). Les souris ont été divisées en quatre groupes : CTL non lésé (n = 3); GW2580 non lésé (n = 4), CTL lésé (n = 5), GW2580 lésé (n = 5). Deux semaines après la chirurgie (ou 2 semaines après le début des injections de BrdU pour les souris non lésées) les animaux sont sacrifiés et les moelles épinières sont disséquées afin d'effectuer une analyse en IRM *ex vivo* pondérée en diffusion et en histologie.

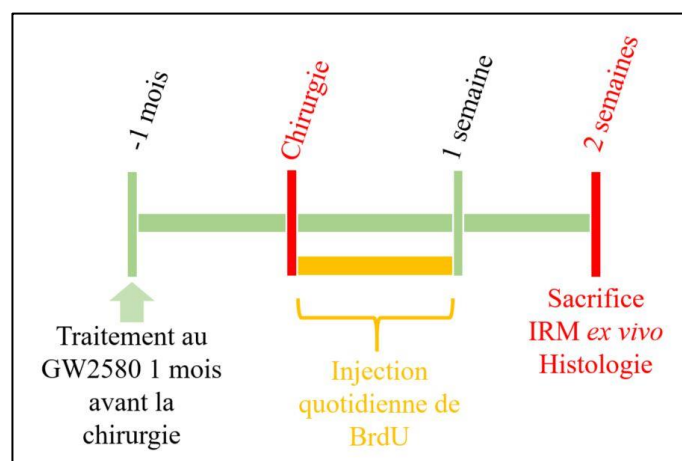


Figure 86 : Groupes BrdU permettant d'étudier les cellules en prolifération après lésion de la moelle épinière.

Le traitement au GW2580 est donné 1 mois avant la chirurgie (sauf pour les groupes CTL) et est administré pendant 1 semaine à partir de la chirurgie. Pour les groupes non-lésés, le BrdU est administré un mois après le début du traitement pendant une semaine.

a) Immunohistochimie :

Pour la détection de BrdU, les sections sont pré-incubées dans du HCl 2N pendant 30 minutes pour dénaturer l'ADN, puis elles sont lavées dans du tampon 0.1 M pH 8.5 de borate de sodium (Sigma Aldrich, Gilligham, Royaume-Uni) pendant 3x10 minutes afin de neutraliser le pH. Les sections sont incubées avec l'anticorps primaire, comme décrit précédemment puis rincées avec du PBS 3x10 minutes. Les sections sont ensuite incubées avec l'anticorps secondaire correspondant (Alexa 488 et 594, 1:1000, Life Technologies, Carlsbad, USA). Enfin, les sections sont recouvertes de lamelles en utilisant un milieu de montage fluorescent (Dako, Glostrup, Danemark).

b) Comptage de cellules :

Les cellules doubles positives BrdU/eGFP ont été comptées manuellement en utilisant le logiciel ImageJ (National Institutes of Health, USA). Brièvement, la section contenant l'épicentre et les sections situées à 3.15 mm et 1.26 mm rostral et caudal à l'épicentre ont été utilisées pour l'analyse. Le comptage a été fait en utilisant l'outil Multi-Point dans ImageJ et les résultats ont été exprimés en moyenne \pm erreur standard de la moyenne pour chaque niveau de la moelle épinière.

2.7.2 Approche expérimentale

Le traitement au GW2580 a été donné 1 mois avant d'effectuer la chirurgie. Un groupe de souris traitées au GW2580 (groupe GW, n=12) et un groupe de souris non-traitées (groupe CTL, n=12) sont utilisés dans cette expérience. Le composé est introduit dans la nourriture à une concentration de 0.1%, ce qui correspond à une dose journalière de 150mg/kg/jour pour une souris pesant 20g. La nourriture du groupe CTL a subi la même procédure de préparation que la nourriture expérimentale mais ne contenait pas le composé GW2580.

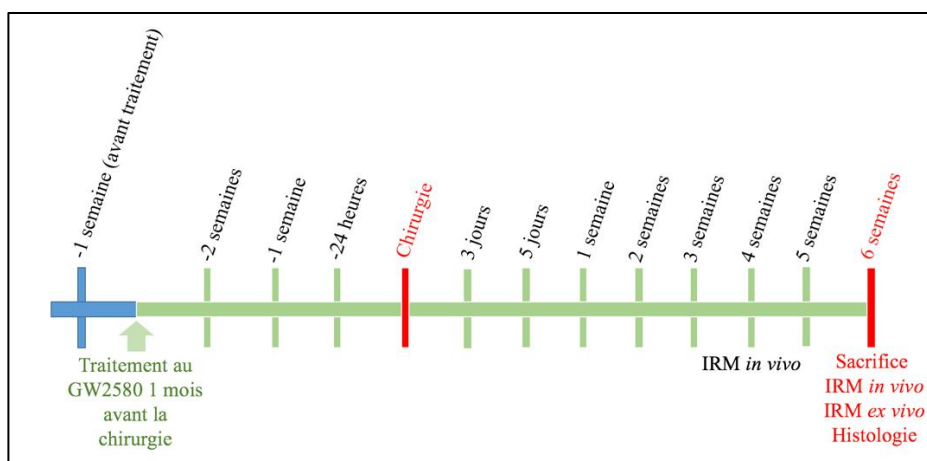


Figure 87 : Temps d'analyse comportementale des animaux traités avant la chirurgie au GW2580. Le traitement est donné 1 mois avant la lésion, jusqu'à la fin de l'expérimentation.

a) Analyse comportementale

Comme présenté dans la Partie 3.10.2, les souris ont suivi des évaluations comportementales (Open field et CatWalk™) à 2 semaines, 1 semaine et 1 jour avant la lésion, puis à 3 jours, 5 jours puis une fois par semaine jusqu'à 6 semaines après la lésion (n=12 pour les groupes CTL et GW2580). Pour plus de précision, l'analyse comportementale est décrite dans la partie 2.4.

b) Analyse IRM pondérée en diffusion

In vivo : les acquisitions sont effectuées à 4 et 6 semaines, avec les paramètres IRM pondérée en diffusion présentés dans la Partie 3.10.3.

Ex vivo : les acquisitions sont effectuées après sacrifice des souris à 6 semaines, avec les paramètres IRM pondérée en diffusion présentés dans la Partie 3.10.3. Les séquences acquises permettent d'obtenir le coefficient de diffusion parallèle (ADC//) pour les deux groupes de souris (3.10.4).

c) Analyse histologique et immunohistologique

Volume lésionnel : Les marquages au bleu de toluidine ont été utilisés pour quantifier le volume lésionnel à 2 et 6 semaines après la lésion médullaire (3.10.3).

Réactivité gliale : Les marquages IBA1 et GFAP ont été utilisés pour quantifier la réactivité microgliale et astrocytaire à 2 et 6 semaines après la lésion médullaire (3.10.5).

d) Comptage de microcavités

Les microcavités ont été mesurées dans la substance grise de la moelle épinière sur des sections colorées au bleu de toluidine en utilisant Photoshop (systèmes Adobe, San José, Californie, USA). La surface des microcavités a été exprimée en pourcentage de la surface totale de la substance grise. Jusqu'à 5 coupes rostrales et caudales au site de la lésion ont été analysées à des intervalles de 630µm dans un segment de 1 cm de la moelle épinière centré autour de la lésion.

2.8 Mise au point d'un modèle de lésion médullaire sur un primate non-humain

2.8.1 Animaux

Cinq mâles microcèbes (*Microcebus murinus*) de deux ans d'âge sont utilisés. Tous les microcèbes sont nés et élevés dans l'animalerie du CECEMA (Centre d'Élevage et de Conditionnement Expérimental des Modèles Animaux, Université de Montpellier, France). Deux microcèbes sont utilisés pour mettre en place à la fois les protocoles chirurgicaux, de comportement et d'IRM *in vivo*. Seuls les 3 animaux ayant suivi toutes les analyses sont présentés dans les données comportementales et d'imagerie *in vivo*. Les animaux sont hébergés ensemble (cages mesurant 2×1×1 m, 3 microcèbes par cage) jusqu'à la chirurgie, puis séparés pendant 1 semaine après la chirurgie. Ils sont finalement remis dans leur cage d'origine. Toutes les cages sont équipées de nichoirs en bois leur servant d'abris. Les animaux sont maintenus à une température standard (24-26°C) et à une humidité relative (55%) et nourris avec des fruits frais et un mélange de céréales, de lait et d'œufs, préparés quotidiennement. L'eau et la nourriture sont données à volonté. Les animaux reçoivent des vers de farine 24 heures après la chirurgie pour augmenter leur apport en protéines. Nous avons également obtenu 3 moelles épinières de microcèbe adulte non lésé pour des expériences histologiques comparatives avec les souris et les humains. Ces microcèbes n'avaient pas été perfusés au paraformaldéhyde 4%, les moelles ayant été uniquement post-fixées.

2.8.2 Hémisection latérale

L'atropine (0,4-0,6 mg/kg, Aguettant, Lyon, France) est administrée par voie sous-cutanée 15 minutes avant l'intervention chirurgicale pour inhiber les sécrétions salivaires et bronchiques, ainsi que la stimulation vagale. La nourriture est retirée 12h avant la chirurgie, l'anesthésie est induite avec 3% à 4% d'isoflurane (Vetflurane, Virbac, Carros, France) et maintenue avec un

mélange de 1% à 2% d'isoflurane et 1 litre/min de débit d'oxygène tout au long de la chirurgie. Un gel pour les yeux est appliqué sur la cornée dès le début de l'anesthésie. La peau est rasée et nettoyée avec un antiseptique (Vetadine, Bayer, Pymble, Australie). La peau et les muscles recouvrant le segment thoraco-lombaire sont coupés le long de la ligne médiane arrière et une laminectomie de l'arc postérieur de la vertèbre lombaire 1 est réalisée. L'hémisection latérale de la moelle épinière est faite au microscope à l'aide d'un micro-scalpel (10315-12; Tools, Foster City, Californie, États-Unis). La zone chirurgicale est nettoyée avec un antiseptique (Vetadine, Bayer). Les muscles et la peau sont suturés et les animaux se réveillent sur un matelas chauffant à température contrôlée. Les animaux sont surveillés deux fois par jour. Les signes de douleur ou de détresse sont observés avec précaution. Ces signes comprennent un refus de manger et de boire, une posture courbée, une absence ou une diminution de l'activité de toilettage et une automutilation (morsure, épilation, coups de griffe sur le visage et les yeux). Les animaux reçoivent un antalgique (buprémorphine, 0.01 mg/kg/jour, par voie intramusculaire) et un antibiotique (enrofloxacin (5 mg/kg/jour, par voie sous-cutanée) pendant 48h après la lésion médullaire. Les poids corporels sont mesurés quotidiennement jusqu'à la stabilisation, puis une fois par semaine. Les animaux sont gardés pendant 3 mois après la lésion.

2.8.3 Etude comportementale

Les évaluations comportementales ont débuté avec des périodes d'entraînement (10, 5 et 2 jours avant la chirurgie) suivies de tests à 1, 3 et 7 jours postopératoires puis une fois par semaine jusqu'à 3 mois après la lésion.

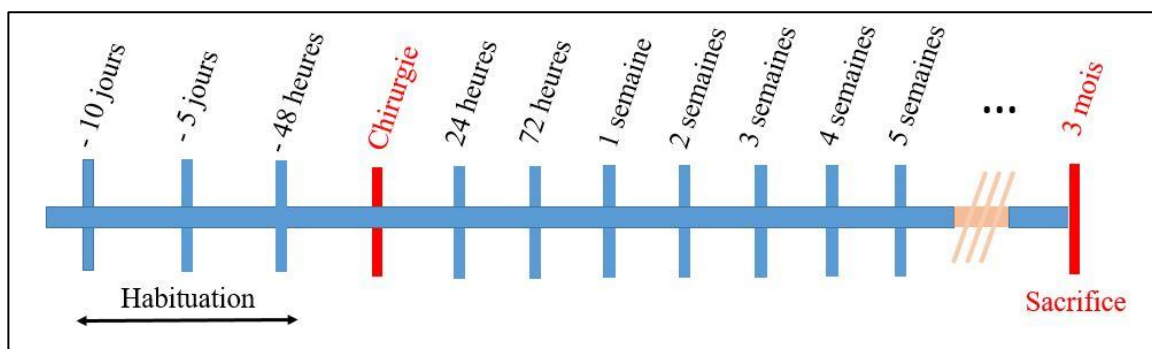


Figure 88 : Temps d'analyse comportementale de l'étude sur les *Microcebus murinus*. Trois temps sont choisis pour habituer les animaux avant la chirurgie, puis à partir d'une semaine en postopératoire l'analyse est faite une fois par semaine jusqu'à 3 mois après la lésion.

Test Open field

Comme précédemment (2.4.2), le suivi de l'activité motrice spontanée est effectué sur les microcèbes. Cette fois, les animaux sont observés durant 10 minutes dans une arène de 50x60cm et un score d'évaluation habituellement utilisés sur les rats est appliqué sur les microcèbes.

Les mouvements des membres postérieurs sont évalués avec des scores allant de 0 à 6 :

- 0 : Pas de mouvement
- 1 : Mouvements à peine perceptible
- 2 : Mouvements fréquent, pas de support du poids
- 3 : Support du poids partiel, pas de marche
- 4 : Support du poids total, marche avec déficit majeur
- 5 : Support du poids total, marche avec léger déficit
- 6 : Marche normale

Test de préhension ou « grip test »

Le « grip test » permet d'évaluer la capacité de l'animal à agripper un objet pour le saisir ou pour grimper par exemple. La capacité de prise est évaluée par 2 expérimentateurs indépendants en utilisant un test de préhension inclinée (60 °, 60 cm) qui permet aux animaux d'atteindre leur nid.



Figure 89 : « Grip test » sur les Microcebus murinus. Les microcèbes sont placés face aux expérimentateurs et chaque patte arrière est évaluée par un score.

Les scores d'analyse vont de 0 à 2 :

- 0 : Aucune tentative de saisir la barre, aucun mouvement des orteils.

1 : Prise partielle, tentative de saisie mais défauts de pose de patte constants, la patte glisse de la barre, et/ou positionnements précis des pattes sur la barre mais les orteils ne saisissent pas.

2 : Prise normale des orteils sur la barre.

Test CatWalk™

Les acquisitions de CatWalk™ sont faites immédiatement après « l'openfield » et le « grip test ». Les animaux marchent vers leur nid sur une plaque en verre illuminé de 1 mètre de long permettant d'enregistrer les empreintes de pas (2.4.1). Un minimum de 5 passages ininterrompus est enregistré par animal et par temps d'analyse. Les données sont analysées à l'aide du logiciel CatWalk 7.1 (Noldus) et CatMerge (InnovationNet, Tiranges, France). Plusieurs paramètres ont été quantifiés (2.4.1).

2.8.4 Suivi longitudinal en IRM *in vivo* pondérée T2

Les acquisitions d'IRM sont réalisées en utilisant un appareil 9.4 Tesla (Agilent Varian 9.4 / 160 / ASR, Santa Clara, Californie, USA) équipé d'un MAGNEX TS1276D, une antenne volumique en quadrature 400MHz RF72 (72mm de diamètre interne, Rapid Biomedical, Rimpar, Allemagne) et associé à un système d'acquisition VnmrJ Imaging (Agilent, Palo Alto, Californie, USA).

Les *Microcebus murinus* sont anesthésiés comme décrit précédemment en utilisant un appareil d'anesthésie compatible avec la résonance magnétique et un système de support d'animal. La respiration et la température corporelle sont surveillées en continu à l'aide du système de surveillance et de déclenchement d'acquisition pour petits animaux. La respiration est maintenue autour de 30 respirations/min. L'analyse longitudinale est effectuée aux moments suivants: 48 heures, 1, 4 et 12 semaines après la lésion.

Les images en orientation transversale sont obtenues avec un protocole de séquence multi coupe écho de spin pondérée T2 (MEMS, Multiple Echo Multi Slices) en utilisant les paramètres suivants : TR = 2500ms; TE = 12.63ms; NE = 2; AVG = 2; FOV = 60x60mm; 35 coupes; Thickness = 0.8mm; Gap = 0mm; matrice d'acquisition ($N_{\text{READ}} * N_{\text{PHASE}}$) = 512x512. Toutes les acquisitions d'images sont synchronisées avec la respiration pour réduire les artefacts de mouvement.

2.8.5 IRM *ex vivo* pondérée T2

Trois mois après l'hémisection, les microcèbes sont anesthésiés avec de la kétamine (0.3ml/100g d'Imalgen 500) et perfusés par voie intracardiaque avec du tampon phosphate salin 0,1 M froid (PBS) suivi de paraformaldéhyde 4% froid (pH 7.2, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), les moelles épinières sont disséquées et post-fixées pendant 2 heures dans 4% de PFA. Pour améliorer le contraste, les moelles épinières sont incubées pendant 48 h dans du gadolinium (1:100 dans du PBS 0.1 M). Juste avant l'IRM *ex vivo*, les tissus sont placés dans du Fluorinert FC-77 dans un tube de verre de 5 mm de diamètre. La moelle épinière est placée dans une antenne volumique en quadrature 400MHz RF43 (43mm de diamètre interne, Rapid Biomedical) et les images en orientation transversale sont obtenues avec un protocole de séquence multi coupe écho de spin pondérée T2 (MEMS, Multiple Echo Multi Slices) en utilisant les paramètres suivants : TR = 1155ms; TE = 13.47ms; NE = 1; AVG = 180; FOV = 10x10mm; 60 coupes; Thk = 0.6mm; Gap = 0mm; matrice d'acquisition ($N_{\text{READ}} * N_{\text{PHASE}}$) = 256x256. Le temps de scan est d'environ 15 heures. La segmentation est faite en utilisant le logiciel Myrian.

2.8.6 Mini-Atlas de la colonne vertébrale et de la moelle épinière de *Microcebus murinus*

Les images de tomographie par ordinateur (CT-scan) sont obtenues en positionnant le corps d'un microcèbe dans un scanner CT Discovery 750 HD (GE Healthcare, Milwaukee, WI, USA).

Les IRM pondérées diffusion *ex vivo* de *M. murinus* non-lésés (2 ans) sont obtenues en utilisant une moelle épinière post-fixée pendant 48 h dans du PFA froid à 4% (pH 7,2, Sigma Aldrich). Juste avant l'IRM, les tissus sont placés dans du Fluorinert FC-77 dans le tube en verre de 4 mm de diamètre de l'antenne solénoïde dédiée aux lésions de la moelle épinière permettant de faire les acquisitions pondérées diffusion dans un temps correct (2.5.3). Les images en orientation transversale sont obtenues avec un protocole de séquence multi coupe écho de spin pondérée diffusion (SEMSdw ; Spin Echo Multi Slice diffusion-weighted) en utilisant les paramètres suivants : TR = 1577.34ms; TE = 34.27ms; AVG = 30; FOV = 10x10mm; 30 coupes; Thk = 1mm; Gap = 0mm; matrice d'acquisition ($N_{\text{READ}} * N_{\text{PHASE}}$) = 256x256 ; Paramètres de diffusion : Le temps de scan est d'environ 3 heures. La segmentation est faite en utilisant le logiciel Myrian.

Les paramètres de diffusion suivants ont été utilisés :

- $G_s = 10 \text{ G/cm-1}$
- $\Delta = 6.88 \text{ ms}$,
- $\text{Séparation} = 15.05 \text{ ms}$
- $B\text{-value} = 522.96 \text{ s/mm}^2$

Les colorations histologiques sont effectuées sur des moelles épinières post-fixées et cryoprotégées, congelées et conservées à $-80 \text{ }^\circ\text{C}$. Des cryosections de $40\mu\text{m}$ d'épaisseur de segments cervicaux, thoraciques, lombaires et sacrés sont recueillies et placées dans du PBS 0.1M. Avant la coloration, toutes les sections sont post-fixées pendant 2h dans du PFA 4%. Deux colorations, sur au moins 5 coupes de la moelle épinière, sont réalisées pour chaque segment: solution de 0.1% de bleu de toluidine (incubation 10 min) et crésyl violet (coloration de Nissl, 0,2%, temps d'incubation 20 min). Toutes les coupes sont montées sur des lames gélatinées, puis sont déshydratées (éthanol à 100%), lavées dans du xylène, et montées entre lame et lamelle en utilisant le milieu de montage Entellan (Merck).

2.8.7 Analyse histologique de la lésion de la moelle épinière chez *M. murinus*

Volume et extension lésionnelle

Le volume lésionnel et l'extension lésionnelle sont analysés de la même manière que précédemment en utilisant le marquage au bleu de toluidine. Le volume est toutefois quantifié en mm^3 et non pas en aire sous la courbe comme pour les autres études.

Immunohistochimie

Comme décrit précédemment (2.6.2), l'immunohistochimie permet d'obtenir une mesure de la densité optique et renseigne donc sur le niveau d'expression de la protéine dans diverses conditions expérimentales et dans les diverses régions de la moelle épinière. Les intensités de coloration de GFAP et IBA1 sont évaluées en mesurant leur densité optique relative (DO) en utilisant ImageJ (National Institutes of Health, Etats-Unis).

Anticorps

Les anticorps primaires utilisés sont l'anticorps de lapin anti-GFAP (1:500, Dako, Glostrup, Danemark) et l'anticorps de lapin anti-IBA-1(1:200, Wako Pure Chemical Industries, Tokyo, Japon).

2.9 Analyses statistiques

Test	Etudes
Wilcoxon (§)	<ul style="list-style-type: none"> • AUC entre CX3CR1 et Aldh111 (IRM diffusion) • CNR entre les ex vivo avec RF43 et SolCoil • CNR entre les ex vivo en T2 et en diffusion
Test de Student non apparié (#)	<ul style="list-style-type: none"> • Niveau d'expression SERT entre CX3CR1 et Aldh111 • Comparaison neuroanatomique des différentes espèces dans l'étude des microcèbes. • Densité optique IBA1 et GFAP entre GW2580 et CTL • Cavitations au bleu de toluidine entre GW2580 et CTL • ADC// entre les CX3CR1 et Aldh111 • ADC// entre GW2580 et CTL • Ratio blanche/grise chez microcèbe, souris et humain • DO rostral/caudal chez microcèbe IBA1 et GFAP
ANOVA 1 voie (*)	<ul style="list-style-type: none"> • Evolution de la lésion au cours du temps dans une même souche de souris (CX3CR1 et Aldh111 séparément) • Comportement entre souris GW2580 et CTL
ANOVA 2 voies (α)	<ul style="list-style-type: none"> • Comportement entre CX3CR1 et Aldh111 • Niveau d'expression IBA1 et GFAP entre CX3CR1 et Aldh111 • Comportement microcèbe en comparant le score de la patte arrière du même côté que la lésion médullaire par rapport au côté contralatéral. • Prolifération BrdU entre GW2580 et CTL • Pourcentage lésionnel en IRM <i>in vivo</i> entre CX3CR1 et Aldh111
Corrélation Spearman	<ul style="list-style-type: none"> • Comparaison des modalités IRM <i>in vivo</i>, <i>ex vivo</i> et bleu de toluidine

Tableau 7 : Liste des tests statistiques utilisés dans chacune des études

Remarques : Chacun des symboles dans le tableau 4 correspond à un test statistique. Les symboles sont présentés dans chacun des graphes de résultats afin de comprendre rapidement quel test statistique a été utilisé. Le test de Wilcoxon a été utilisé à chaque fois que la puissance statistique nécessaire dépendante du nombre d'animaux pour faire un t-test non apparié n'étaient pas atteinte. Le test de Student non-apparié (t-test) est utilisé pour comparer des résultats à un temps post-lésionnel donné (autrement dit, pour une comparaison point-par-point).

2.10 Présentation des résultats

L'analyse par IRM chez les rongeurs est une approche non invasive prometteuse pour suivre l'évolution d'une lésion médullaire. Cependant, une question importante persiste : les analyses IRM *in vivo* et *ex vivo* chez les rongeurs sont-elles suffisamment sensibles pour évaluer des modifications qui pourraient être corrélées avec des différences de récupération fonctionnelle ? Afin de répondre à cette question, nous avons décidé de caractériser au cours du temps l'extension et le volume de lésion en IRM *in vivo* pondérée en T2 et en diffusion. Pour compléter ces IRM *in vivo*, nous avons développé l'IRM *ex vivo* haute résolution et effectué des analyses histologiques. Pour chacune des modalités d'analyse, nous avons mesuré le volume lésionnel pour chaque coupe, mais aussi l'extension lésionnelle rostro-caudale. Nous avons ensuite analysé la possible corrélation entre la récupération fonctionnelle des animaux et les valeurs obtenues en IRM. Les segmentations effectuées lors des analyses IRM et histologiques ont permis d'identifier 3 paramètres :

- Le volume lésionnel : il correspond à la somme des volumes de toutes les coupes présentant une lésion. La surface lésionnelle est multipliée par l'épaisseur de la coupe, le volume obtenu est exprimé en mm³. Néanmoins, nous avons choisi de calculer l'aire sous la courbe de la lésion pour effectuer nos analyses statistiques. Contrairement à la somme de tous les volumes, c'est une mesure intégrée des surfaces lésionnelles le long de l'axe rostro-caudal, qui prend également en compte les sections les plus rostrales et caudales. L'aire sous la courbe permet donc d'inclure le volume lésionnel contenu dans l'épaisseur de la coupe que l'on ne peut identifier. Nous avons choisi la méthode d'intégration approchée, dite des trapèzes.

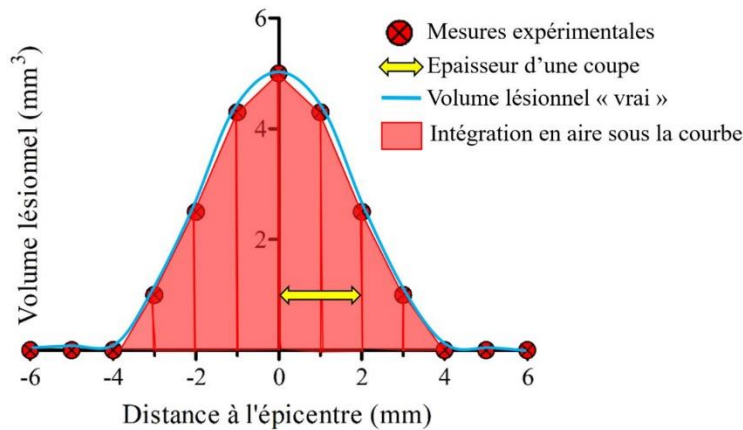


Figure 90 : Quantification du volume lésionnel. Le volume lésionnel est caractérisé par l'aire sous la courbe. L'épicentre est à 0mm. L'expression en aire sous la courbe permet de ne pas négliger le volume des premières coupes avec lésion en rostral et des premières coupes sans lésion en caudal.

- Le pourcentage lésionnel : il correspond au volume de la zone lésée par rapport au volume total et est exprimé en pourcentage. L'une des valeurs les plus importantes dans l'étude est le pourcentage à l'épicentre et il est obtenu sur la coupe où l'aire lésée est la plus importante ; il est approximativement de 50% dans le cadre d'une hémisection de la moelle épinière.

- L'extension lésionnelle rostro-caudal : elle correspond au nombre de coupes sur lesquelles on peut identifier une lésion ; ce nombre est ensuite multiplié par l'épaisseur d'une coupe. Par exemple, dans la Figure 91, avec l'IRM *ex vivo*, l'extension lésionnelle sera estimée à 5mm puisque la lésion est identifiable sur 5 coupes d'une épaisseur de 1mm sur l'axe rostro-caudal.

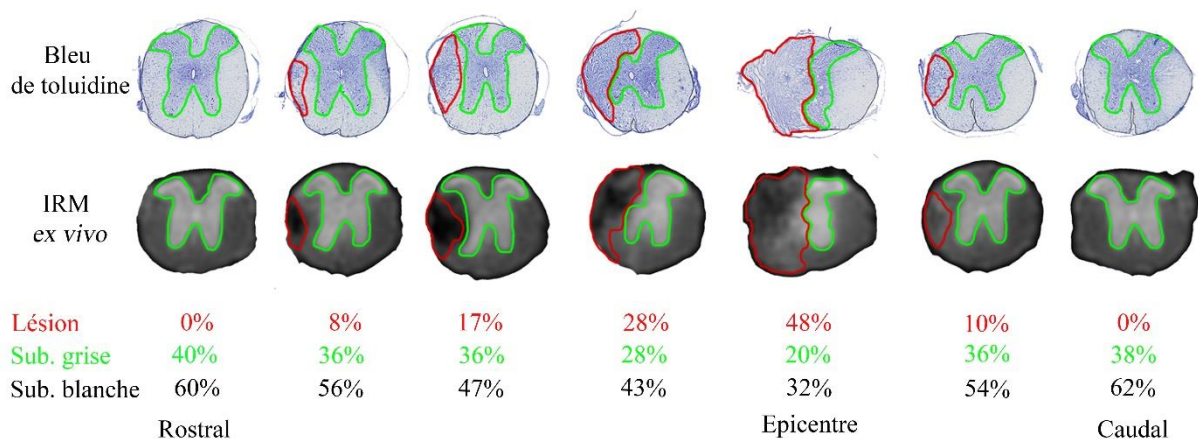


Figure 91 : Illustration de la segmentation manuelle des différentes régions d'intérêt (ROI) de la moelle épinière, permettant d'obtenir un pourcentage de chaque région. La lésion est identifiée en rouge, la substance grise en vert.

Les analyses en IRM et en histologie sont effectuées le long de l'axe rostro-caudal. En effet, nous souhaitons avoir des informations sur le site lésionnel et son extension résultant des phénomènes de lésions secondaires, mais aussi sur des régions à distance du site lésionnel. Ainsi, les résultats sont la plupart du temps présentés sous forme d'un graphe sur lequel l'abscisse représente la distance en millimètre, et sur l'ordonnée le paramètre mesuré (Fig. 94).

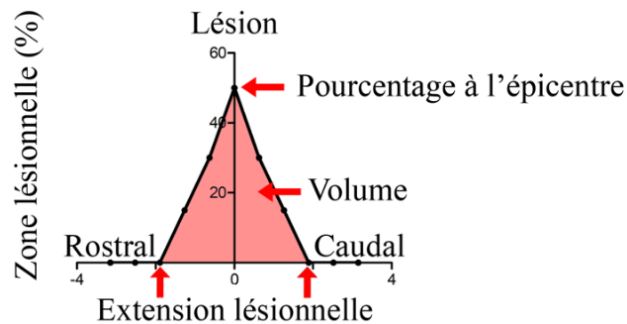


Figure 94 : Illustration d'un graphe présentant la quantification de la lésion

Dans tous les graphes, les barres représentent la moyenne \pm erreur standard sur la moyenne.

Remarque : Les souches de souris utilisées expriment une protéine fluorescente, l'eGFP (enhanced green fluorescent protein) dans les microglies (CX3CR1) ou les astrocytes (Aldh1l1). Il n'y a pas d'avantage à utiliser des souris exprimant une protéine fluorescente lorsque l'on utilise l'IRM. Néanmoins, ces animaux ont été choisis car ils sont utilisés dans le laboratoire depuis plusieurs années. En effet, l'expression d'eGFP par les microglies ou les astrocytes ont permis d'effectuer un tri spécifique de ces types cellulaires en faisant un FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) pour ensuite permettre une analyse transcriptomique de populations pures de cellules gliales dans deux sévérités de lésion médullaires (Noristani, Gerber, et al. 2017; Noristani et al. 2016).

3. Résultats expérimentaux

3.1 Suivi comportemental : comparaison des souches de souris CX3CR1 et Aldh111

Un test comportemental optimal doit être assez sensible pour détecter des différences de performances comportementales qui résultent de différences de sévérité de blessure. Il doit être reproductible, afin de permettre l'obtention de résultats indépendants des conditions d'acquisition (expérimentateur ou le laboratoire).

Pour examiner les différences de récupération fonctionnelle entre les deux souches murines, nous avons évalué les fonctions sensori-motrices chez les souris CX3CR1 et les souris Aldh111 à différents temps post-lésionnels.

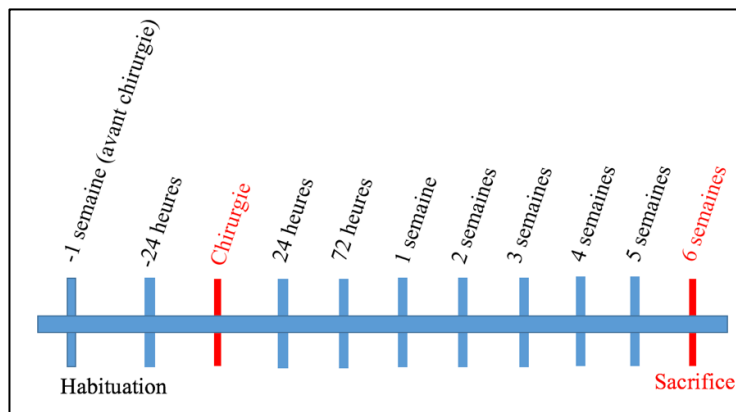


Figure 92 : Temps d'analyse comportementale. Les 2 souches ont été analysées aux mêmes temps.

3.1.1 Evolution pondérale

La valeur de 100% représente le poids moyen des animaux avant la chirurgie. Le poids des animaux a été mesuré quotidiennement afin de vérifier la bonne santé des animaux après la lésion de la moelle épinière, mais aussi afin de vérifier l'absence de trop grandes variations qu'il faudrait prendre en compte pour les analyses comportementales. En effet, la pression exercée au niveau de chaque patte étant évaluée, une différence de poids importante pourrait influencer les mesures du CatWalk™. Le suivi du poids des animaux est effectué dans la grande majorité des études comportementales, pour vérifier entre autre l'effet d'un traitement sur le métabolisme général de l'animal.

Les deux premiers jours après la chirurgie, les souris perdent environ 10% de leur poids, ce qui est dû à la quasi absence d'alimentation, ainsi qu'à la faiblesse générale des animaux (Fig. 93). Les souris CX3CR1 reprennent une alimentation normale et récupèrent donc rapidement du poids. Après 2 semaines, les souris CX3CR1 retrouvent leur poids précédant la chirurgie et après 5 semaines, présentent même un poids 10% supérieur au poids avant chirurgie. L'augmentation par rapport au poids initial résulte de la croissance normale des animaux qui au moment de la chirurgie ont 3 mois d'âge et 4 mois et demi en fin d'expérience. Les souris Aldh111 récupèrent leur poids bien plus lentement, et à la fin de l'expérience, elles n'ont pas repris la totalité des 10% perdus après la chirurgie. Cette absence de récupération pondérale pourrait être due à la récupération fonctionnelle moindre de cette souche et donc un développement musculaire moindre. Les souris CX3CR1 montrent une meilleure récupération de poids que les souris Aldh111, et ce dès 4 jours après la chirurgie. De plus, l'évolution pondérale des souris CX3CR1 reste supérieure à celle des Aldh111 jusqu'à la fin des mesures.

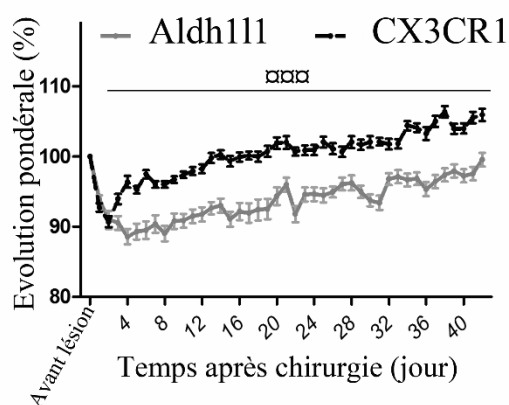


Figure 93 : Evolution du poids des souris au cours du temps. Comparaison des souris CX3CR1 (noir) et Aldh111 (gris). ANOVA 2 voies : *** $p < 0.001$

3.1.2 Coordination de la marche

Nous avons évalué la fonction locomotrice des deux souches de souris à la suite d'une hémisection latérale de la moelle épinière au niveau thoracique 9 à l'aide d'une analyse dynamique de la marche et de l'activité motrice spontanée (2.4.1). Pour cela, nous avons utilisé le CatWalk™, qui par un enregistrement automatisé et fin de la locomotion permet la quantification précise du patron de la marche volontaire sans système de récompense ou contraintes extérieures. Pour tous les paramètres analysés, la notion de vitesse de déplacement des animaux a été prise en compte. En effet, le patron de déplacement étant modifié par la vitesse, tous les paramètres analysés l'ont été dans une gamme de vitesse identique pour les deux souches de souris.

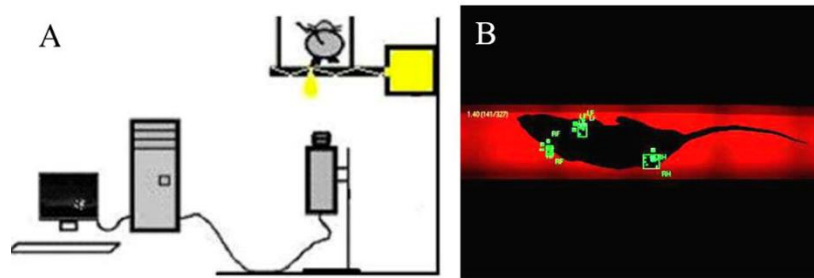


Figure 94 : Analyse « CatWalk™ ». Schéma du « CatWalk™ » (A) permettant l'enregistrement des positions des pattes (B, empreintes verte) par une caméra positionnée sous l'animal.

Le "Regularity index", ou index de régularité, correspond à une mesure de la coordination entre les pattes. L'analyse de cet indice entre les deux souches de souris a montré une meilleure coordination entre les pattes arrière chez les souris CX3CR1 par rapport aux souris Aldh111 à 72 heures et 1 semaine après une hémisection spinale (Fig. 95). Pour un animal non-lésé présentant une coordination normale, la valeur de l'index de régularité est de 100%.

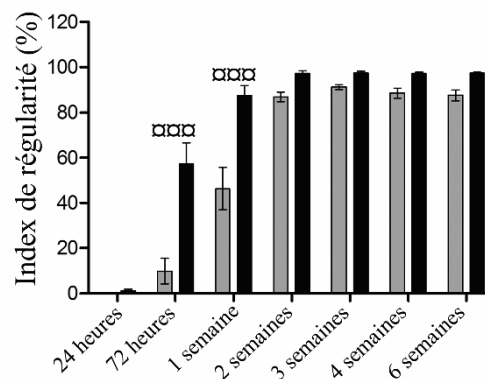


Figure 95 : Analyse de l'index de régularité au cours du temps. Comparaison des souris CX3CR1 (noir) et Aldh111 (gris). Statistiques : ANOVA 2 voies : $\square\square\square p < 0.001$

L'index de régularité est couramment utilisé dans le cadre de l'étude des lésions de la moelle épinière et des nerfs périphériques (Chen et al. 2014). Il est en effet important d'évaluer la récupération de motricité, mais aussi la finesse de cette récupération. Ce paramètre est par ailleurs évalué dans l'étude de la douleur ou de certaines maladies neurodégénératives comme la maladie de Leigh, qui touche le tronc cérébral et donc les acquisitions motrices. En effet, lorsque l'index de régularité diminue, il permet de détecter de manière sensible une altération de la marche (de Haas, Russel, and Smeitink 2016). Les souris CX3CR1 présentent donc plus rapidement après la lésion une récupération de la coordination motrice.

3.1.3 Support des pattes

Le "Duty cycle" et le "Max area" de la Figure 96 indiquent un meilleur support du poids des pattes postérieures chez les souris CX3CR1 par rapport aux Aldh111. Une valeur de 100% correspond à la valeur avant chirurgie. Les mesures post-lésionnelles sont ensuite normalisées par rapport à la valeur avant lésion.

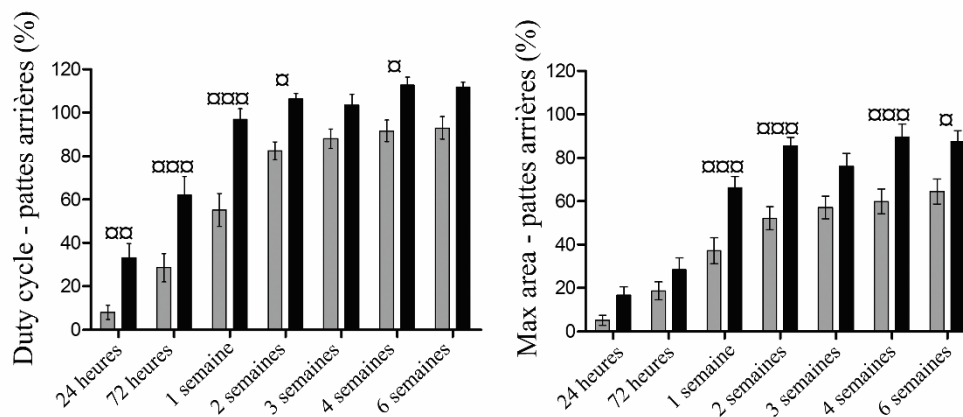


Figure 96 : Analyse du « Duty cycle » et « Max area » au cours du temps. Comparaison des souris CX3CR1 (noir) et Aldh111 (gris). ANOVA 2 voies : * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

La combinaison du « duty cycle » et du « max area » donne une information sur la capacité de l'animal à soutenir son propre poids, donc sur la récupération fonctionnelle. En effet, lorsque l'on analyse ces paramètres en regardant par exemple les pattes postérieures, les souris vont exercer une force plus ou moins importante sur la plaque en verre en fonction de leur récupération. Ces paramètres donnent un indice sur combien de temps l'animal va laisser sa patte posée sur la plaque par rapport à un cycle de pas, et avec quelle intensité. Un animal qui laisse très peu de temps sa patte posée sur la plaque reflète peut-être une douleur au moment du contact. Au contraire, si le contact est plus long qu'avant la lésion ceci reflète une altération de la capacité motrice. Dans les deux cas, ces paramètres reflètent une dégradation de motricité/sensitivité induite par la lésion. Il est à noter, qu'une patte totalement paralysée n'est pas prise en compte, car la trace de la patte n'est pas détectée par la caméra du CatWalk™. Une étude récente utilisant un modèle de douleur a par ailleurs validé l'utilité de ces paramètres en trouvant une différence significative dans la démarche de rats ayant subi une hernie discale en L5 (Kameda et al. 2017). On peut aussi émettre l'hypothèse qu'il y a un phénomène de compensation de la patte située du côté non lésé. En effet, si la patte gauche est paralysée, l'animal s'appuiera plus intensément et plus longtemps sur sa patte droite. Le « duty cycle » et le « max area » représentant la moyenne des valeurs des deux pattes une compensation sera

probablement insuffisante pour atteindre une valeur de 100%. Nous observons un retour à la valeur de 100% à partir de 2 semaines pour les souris CX3CR1. Ceci permet donc de déduire que les souris CX3CR1 récupèrent mieux et plus rapidement (dès 24 heures) après une hémisection médullaire. Cette meilleure récupération persiste jusqu'à 6 semaines, temps correspondant à la fin de l'expérience.

3.1.4 Activité et anxiété

L'analyse avec l'Open field permet de mesurer l'activité motrice spontanée et l'anxiété des souris (2.4.2).

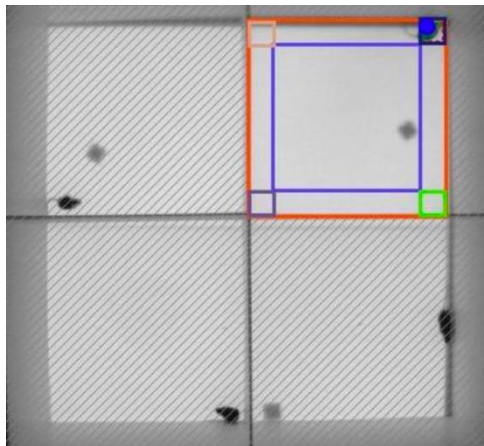


Figure 97: Système de l'Open field permettant la mesure de l'activité motrice spontanée et l'anxiété des souris.

Lorsque nous avons analysé la distance totale parcourue et la vitesse de déplacement moyenne des deux souches de souris, nous n'avons trouvé aucune différence significative. La différence entre les souches réside dans la zone d'exploration préférentielle des souris (Fig. 98A&B). Les souris CX3CR1 sont moins soumises à l'anxiété induite par la lésion, en effet, elles passent plus de temps dans la zone considérée comme non-protégée, c'est-à-dire le carré central de l'enceinte à partir de 3 semaines après la lésion (Fig. 98A). Elles sont aussi moins immobiles que les souris Aldh111 dès 72 heures après la lésion, on considère l'immobilité comme l'absence de mouvement pendant plus de 2 secondes (Fig. 98B).

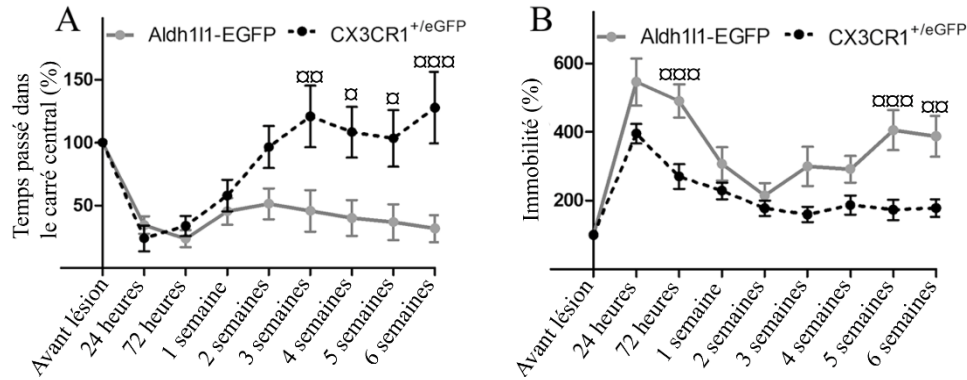


Figure 98 : Analyse Open field de l'activité spontanée et de l'anxiété au cours du temps. Comparaison des souris CX3CR1 (noir pointillé) et Aldh111 (gris) en terme de temps passé dans le carré central (A) et en terme d'immobilité (B). ANOVA 2 voies : * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

L'immobilité est considérée comme un révélateur d'anxiété puisque l'animal ne se déplace pas de manière homogène et marque de longs arrêts. Les rongeurs, lorsqu'ils ne sont pas anxieux, passant la plupart de leur temps à explorer un nouveau milieu. Lorsqu'ils explorent l'enceinte de « l'Open field », ils préfèrent la périphérie par rapport au carré central. « L'Open field » est classiquement utilisé afin d'évaluer l'anxiété des rongeurs; il a par exemple été démontré grâce à cette méthode que certains animaux présentent un phénotype anxieux lorsqu'ils sont soumis à une hyperstimulation auditive et visuelle ou à un exercice physique volontaire (Fuss et al. 2010; Christakis, Ramirez, and Ramirez 2012).

Il a très récemment été montré qu'après une contusion de la moelle épinière, des souris dont on a volontairement altéré le fonctionnement des récepteurs GABA en inactivant la PRIP1 (phospholipase C-related inactive protein type 1), développent un phénotype d'anxiété plus important que les souris de type sauvage. Les récepteurs GABA sont notamment impliqués dans la régulation de la peur et de l'anxiété. L'inactivation de la PRIP1 est donc responsable de troubles affectifs. Dans cette étude, l'augmentation du comportement anxieux est associée à une amplification de l'altération motrice et à une augmentation de l'expression de la GFAP et de l'IBA1 à l'épicentre de la lésion reflétant une gliose augmentée (Fujita et al. 2018). Ceci est en accord avec un rapport précédent montrant qu'après une contusion de la moelle épinière, les rats développant une dépression et un comportement anxieux présentent un niveau plus élevé de cytokines pro-inflammatoires périphérique (sérum) et dans le système nerveux central (hippocampe et moelle épinière) que les rats développant uniquement une dépression sans comportement anxieux (Maldonado-Bouchard et al. 2016).

3.1.5 Sensibilité tactile

Afin d'évaluer une éventuelle modification dans la sensibilité tactile des souris, nous avons utilisé « l'Open field » dont le fond des enceintes a été recouvert de papiers de verre avec des granulosités différentes (2.4.2).

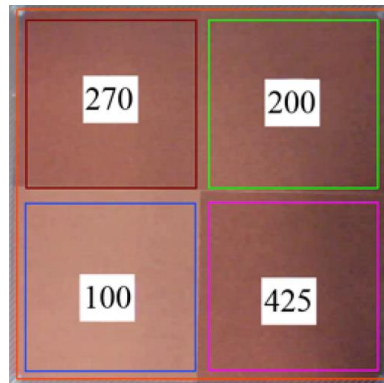


Figure 99: Open field recouvert de papiers de verre à différentes granulosités.

Selon la granulosité du papier de verre, les différentes parties de l'enceinte ont été considérées comme plus ou moins lisses ou rugueuses. La partie de l'enceinte présentant une granulosité de 100 μm a été considérée comme lisse tandis que les 3 autres parties (supérieures ou égale à 200 μm) ont été considérées comme rugueuses (Fig. 99). Les souris Aldh111 ont montré une préférence particulière pour la partie rugueuse par rapport aux souris CX3CR1 (Fig. 100A). En effet, nous avons observé une diminution du temps passé dans la partie lisse à 4 semaines après la lésion, et une augmentation du temps passé dans la partie rugueuse à 3, 4 et 5 semaines après la lésion pour les souris Aldh111 (Fig. 100B).

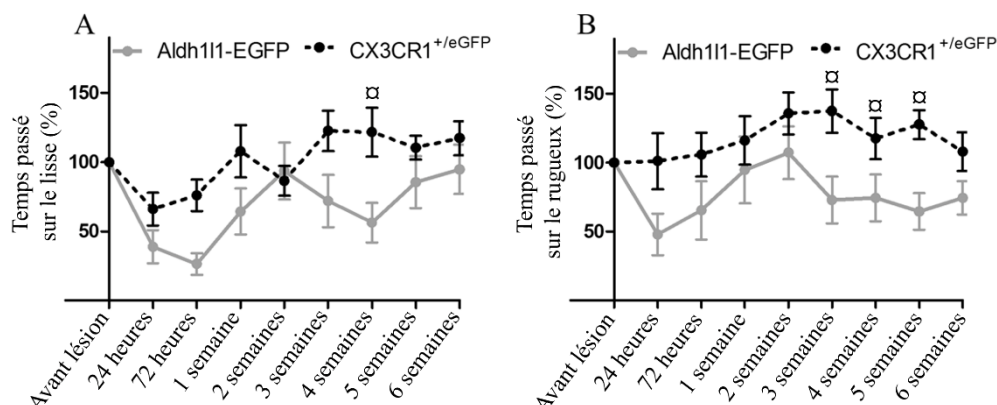


Figure 100 : Analyse Open field de la sensibilité tactile au cours du temps. Comparaison des souris CX3CR1 (noir pointillé) et Aldh111 (gris) en terme de temps passé dans la partie lisse (A) et dans la partie rugueuse de l'enceinte (B). ANOVA 2 voies : $\text{**}p < 0.05$

Nous avons utilisé le papier de verre de différentes granulosités pour évaluer la récupération sensorielle suite aux travaux de l'équipe de Wetzels qui travaille sur le toucher et la douleur mécanique (Wetzels et al. 2007). Ils ont utilisé des souris mutées n'exprimant pas la stomatoline-like protein SLP3, ceci induisant une absence de réponse à des stimuli mécaniques de 35% des mécanorécepteurs. La sensibilité tactile et la réponse nociceptive sont en général évaluées en utilisant le test de Von Frey. Ce test est composé d'un jeu de monofilaments qui, en fonction de leurs diamètres, vont appliquer une force variable quand ils seront appliqués sur la peau. La perception de l'intensité du contact permet d'évaluer une potentielle hyper ou hypoalgésie, si l'animal retire sa patte, on considère qu'il a eu une stimulation suffisante pour percevoir le contact. Ceci permet l'identification d'un seuil de réponse, celui-ci sera augmenté en hypoalgésie et diminué en cas d'hyperalgésie.

Conclusion de l'analyse comportementale : Les souris CX3CR1 présentent une meilleure récupération fonctionnelle spontanée que les souris Aldh1l1 après une hémisection latérale de la moelle épinière. Par ailleurs, les souris CX3CR1 présentent aussi une meilleure récupération du poids corporel, une anxiété post-lésionnelle réduite et une légère amélioration de réponse sensitive.

3.2 Caractérisation des temps T1 et T2 la moelle épinière à 9.4T

3.2.1 Temps T1 et T2 *ex vivo*

Le Tableau 5 résume les paramètres d'ajustement obtenus, le T1, le T2 et le rapport signal sur bruit maximum pour un tissu donné (M0 / bruit).

	$\frac{M0_1}{\text{Bruit}_1}$	T1	$\frac{M0_2}{\text{Bruit}_2}$	T2
Substance grise	32±1.60	1422±71ms	28±1.39	30.2±1.51ms
Substance blanche	25±1.25	1384±69ms	20±1.20	29±1.43ms
Lésion	19±0.99	1219±61ms	19±0.94	19±0.94ms

Tableau 8 : Propriétés de résonance magnétique *ex vivo* des tissus de la moelle épinière.

3.2.1 Temps T1 et T2 *in vivo*

Le Tableau 7 résume les paramètres d'ajustement, le T1, le T2 et le rapport signal sur bruit maximum pour un tissu donné (M0 / bruit).

	$\frac{M0_1}{\text{Bruit}_1}$	T1	$\frac{M0_2}{\text{Bruit}_2}$	T2
Substance grise	48±3.61	1300±97ms	34±2.53	48±3.63ms
Substance blanche	45±3.36	1672±125ms	32±2.39	40±3.02ms
Lésion	35.43±2.65	1410±106ms	27.43±2.06	30±2.17ms

Tableau 9 : Propriétés de résonance magnétique *in vivo* des tissus de la moelle épinière.

Nous avons ensuite utilisé les paramètres obtenus en *in vivo* et *ex vivo* pour modéliser le rapport contraste sur bruit (CNR) entre les tissus avec différentes configurations d'acquisition. Ainsi, nous avons pu concevoir nos protocoles IRM en fixant les paramètres d'acquisition (TR, TE, AVG, FOV, Résolution) qui optimisent le temps d'acquisition et le CNR entre les différents tissus (Partie 2.5.1).

En 2005, les paramètres T1 et T2 de la moelle épinière dans un champ magnétique de 9.4T ont été mesurés. Le T1 de la substance grise était de 1690ms et de 1730ms dans la substance blanche. Le T2 mesuré était de 38ms dans la substance grise et 33ms dans la substance blanche (Mehmet Bilgen et al. 2005). Nos mesures se rapprochent de ces valeurs, prenant en compte les

variabilités inhérentes aux mesures, et surtout le contexte de la moelle épinière. En effet, notre mesure a été effectuée dans un contexte lésé, alors que les souris étaient saines dans le cas de l'étude précédente.

D'après ces valeurs, il est probable que les temps de relaxations T1 et T2 diminuent à cause d'une perte de structure cellulaire après une lésion de la moelle épinière. De plus, il a été démontré que les propriétés physiques T1 et T2 changent en fonction de l'âge des animaux et de la localisation de la région observée (Guilfoyle et al. 2003). Plus précisément, les animaux plus jeunes présentent des temps de relaxation légèrement plus long (10%). Au moment de la mesure des T1 et T2, nos animaux avaient 3 mois, contre 6 mois pour l'étude précédente, ce qui pourrait expliquer la légère différence de valeurs. Les mesures de T1 et de T2 ont aussi été effectuées sur le rat, et il semblerait que le T1 des substances grise et blanche soit plus court que chez la souris (1000ms). Les mesures ont été effectuées en 1999, sur un appareil 2T, il est donc possible que les variations entre les deux espèces soient aussi dues au champ, et à la difficulté d'obtenir de bons contrastes pour effectuer les mesures (Narayana, Fenyés, and Zacharopoulos 1999).

3.3 Suivi longitudinal en IRM *in vivo* pondérée en T2 : comparaison des souris CX3CR1 et Aldh111

Pour évaluer une potentielle corrélation entre la récupération fonctionnelle spontanée et l'évolution de la lésion au cours du temps, nous avons effectué un suivi longitudinal de 24 heures jusqu'à 6 semaines après la lésion en IRM *in vivo* pondérée T2 sur les deux souches de souris. Les mêmes souris ont donc été imagées et l'évolution de leur lésion a été évaluée (2.1).

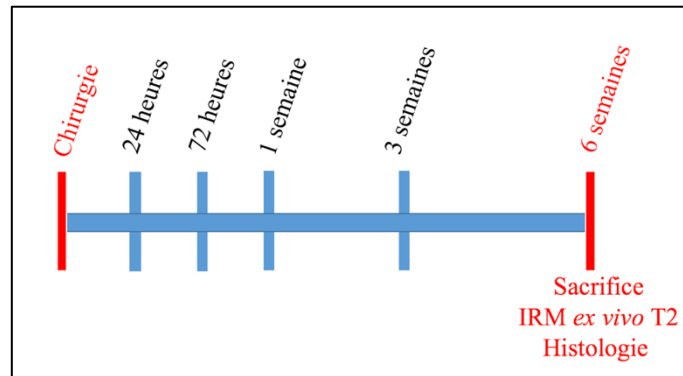


Figure 101 : Suivi longitudinal en IRM *in vivo* pondéré T2. Les souris ont été suivies au cours du temps et l'analyse de la lésion a été effectuée à tous les temps d'acquisition.

3.3.1 Qualité du signal en IRM *in vivo* pondérée en T2

Afin de comprendre les potentielles différences dans la quantification des lésions de la moelle épinière suivant la modalité utilisée, nous avons choisi d'évaluer la qualité du signal. Si la qualité du signal est satisfaisante, alors il est possible de discuter sur les résultats physiologiques obtenus (pourcentage lésionnel, extension lésionnelle, identification d'un œdème, évolution au cours du temps). Il est aussi nécessaire de vérifier que l'intensité du signal ne dépend pas uniquement de l'antenne et de son réglage, mais aussi des propriétés intrinsèques des tissus. C'est pour cela que nous avons choisi dans un premier temps de mesurer le signal pour chacune des deux souches de souris évaluées.

Si la qualité de l'acquisition est insuffisante, il est alors difficile d'accorder une confiance suffisante à la mesure effectuée grâce à cette expérience. Pour évaluer la qualité du signal obtenu en utilisant l'IRM *in vivo* pondérée en T2, nous avons d'abord mesuré le signal obtenu sur les acquisitions effectuées 6 semaines après la chirurgie, et ce sur les différentes zones de la moelle épinière : substance grise, substance blanche, lésion et bruit de fond. A partir de ces valeurs de signal, nous avons calculé le signal sur bruit et le contraste sur bruit, pour les deux souches de souris.

Après comparaison statistique du SNR et du CNR des deux souches, aucune différence n'a été détectée. Nous avons donc décidé de discuter la moyenne des signaux et non plus les deux souches séparément. Pour évaluer le signal obtenu avec les paramètres IRM choisis, 32 images provenant des différents animaux suivis à différents temps post-lésionnels sont utilisées, au niveau de l'épicentre.

En moyenne, sur 32 images en IRM *in vivo* pondérée T2, le SNR est de **22.05 ± 0.55**. Cette valeur représente la moyenne des rapports signal sur bruit de toutes les régions d'intérêt confondues (substance grise, blanche et lésion).

<i>Signal sur bruit</i>	Substance grise	Substance blanche	Lésion
SNR	24.47 ± 0.99	21.17 ± 0.87	20.50 ± 0.89

Tableau 10 : Signal sur bruit des différentes régions de la moelle épinière en IRM *in vivo* pondérée T2.

Dans le cas de l'IRM *in vivo* pondérée T2, la lésion apparait en moyenne en hyposignal par rapport aux substances grise et blanche. Le SNR est largement suffisant pour identifier un tissu par rapport au bruit, mais il ne donne pas d'indice sur la facilité de distinguer les différentes parties de la moelle épinière lésée. Il respecte en effet largement le critère de Rose qui indique qu'un minimum de SNR > 5 est nécessaire pour être capable de distinguer les caractéristiques

d'une image avec une certitude absolue. Un SNR inférieur à 5 signifie ne pas pouvoir être certain des détails observé dans l'image (Rose 1948).

<i>Contraste sur bruit</i>	Substance grise / Substance blanche	Substance grise / Lésion	Substance blanche / Lésion
CNR	3.31 ± 0.23	4.04 ± 0.51	2.31 ± 0.3

Tableau 11 : Contraste sur bruit des différentes régions de la moelle épinière en IRM in vivo pondérée T2.

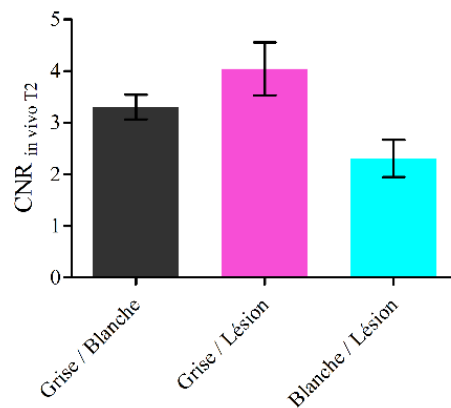


Figure 102 : CNR mesuré sur les IRM in vivo pondérée T2.

On retrouve logiquement le contraste le plus important entre la substance grise, qui a le SNR le plus haut, et la lésion, qui a le SNR le plus bas. Au contraire, les intensités de signaux sont assez proches entre la substance blanche et la zone lésée. Les analyses étant effectuées manuellement par l'opérateur, il est possible qu'un lien entre un contraste suffisant et une analyse correcte soit suffisant. La segmentation manuelle est plus aisée lorsqu'il s'agit de discriminer la lésion et la substance grise (CNR=4.04) que lorsqu'il s'agit d'identifier la substance blanche préservée au milieu du site lésionnel (CNR=2.31). Il existe un contraste « naturel » entre la substance grise et la blanche, même dans une séquence dans laquelle il reste un effet T1, qui peut être attribué à la différence de densité de proton connue entre les deux régions (Narayana, Fenyés, and Zacharopoulos 1999).

3.3.2 Quantification de la lésion en IRM *in vivo* pondérée en T2

Le suivi longitudinal en IRM *in vivo* pondérée T2 est effectué en analysant 28 images axiales de 0.6mm d'épaisseur sur un segment de 1.68 cm centré sur l'épicentre de la lésion. Un protocole « scout » en vue sagittale est effectué afin de positionner le champ de vue et de centrer les 28 coupes sur l'épicentre lésionnel. La segmentation est effectuée manuellement en segmentant les parties préservées et les parties lésées sur toutes les images axiales (Fig. 103).

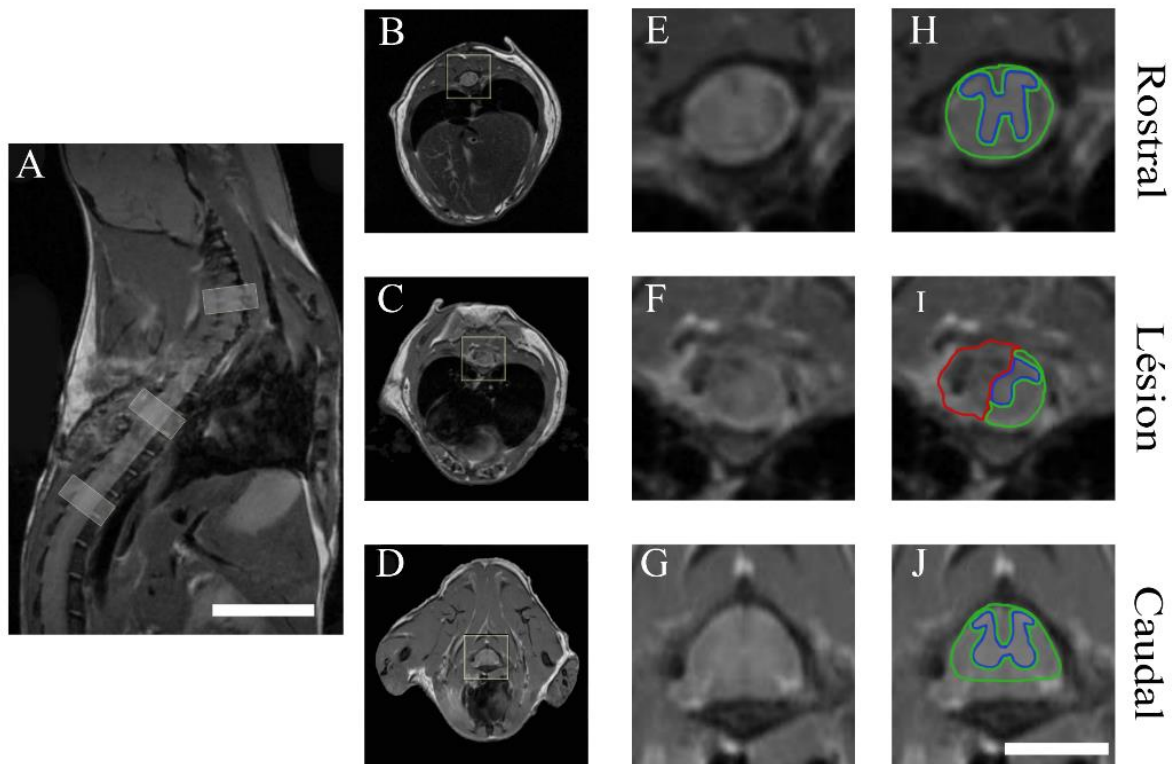


Figure 103 : Suivi longitudinal en IRM *in vivo* pondérée T2. Image sagittale *in vivo* (A). Images axiales *in vivo* prises rostralement (B), au sein (C) et caudalement (D) à l'épicentre lésionnel. Les niveaux ont été indiqués sur l'image dans les rectangles blancs (A). Images zoomées des carrés blancs indiqués en (B), (C) et (D) (E-G). Segmentation de la substance grise préservée (bleu), de la substance blanche préservée (vert) et du tissu lésé (rouge) (H-J). Echelle (A) : 6mm, (B-J) : 2.5mm.

Lorsque l'on compare la moyenne des pourcentages à l'épicentre de 24 heures à 6 semaines, aucune variation significative n'est observée (ANOVA 1 voie). Il n'y a pas de différence non plus lorsque l'on compare les souches par temps d'analyse (Wilcoxon, Fig. 104).

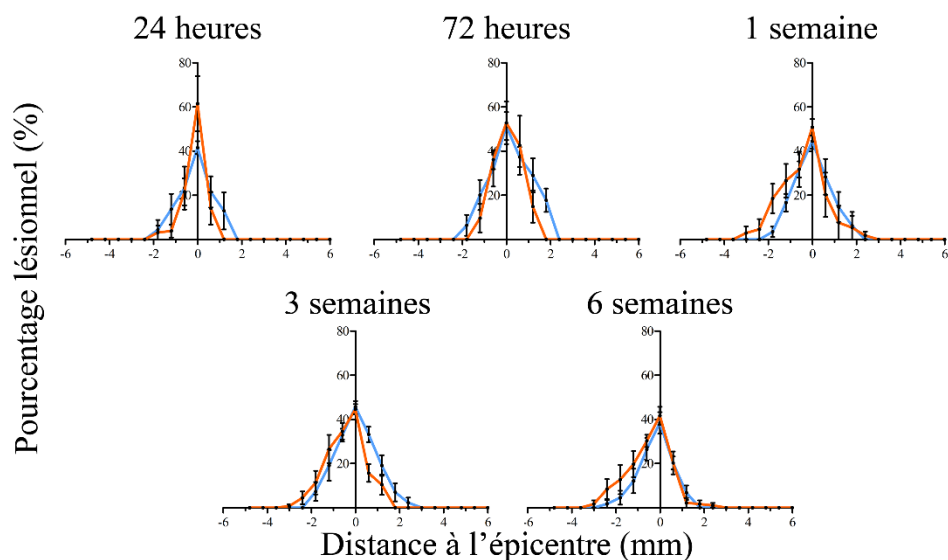


Figure 104 : Quantification longitudinale du pourcentage lésionnel de 24 heures à 6 semaines après la chirurgie des souris *CX3CR1* (courbe orange) et des souris *Aldh111* (courbe bleue) en utilisant l'IRM *in vivo* pondérée en T2.

L'analyse du volume lésionnel, exprimé en aire sous la courbe, n'a pas montré de différence entre les souches (Tab. 12).

<i>AUC</i>	24 heures	72 heures	1 semaine	3 semaines	6 semaines
<i>Aldh111</i>	70	116	85	100	66
<i>CX3CR1</i>	62	94	102	89	84

Tableau 12 : Aires sous la courbe (*AUC*) obtenues en IRM *in vivo* pondérée en T2 correspondant à la quantification du volume lésionnel sur l'axe rostro-caudal.

L'analyse de l'évolution de l'extension au cours du temps ne montre pas de différence entre les divers temps d'analyse (ANOVA 1 et 2 voies, Fig. 105).

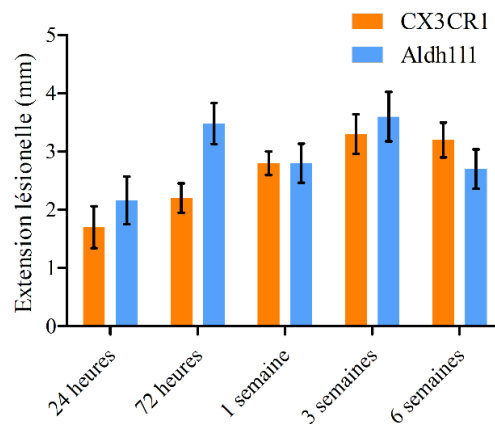


Figure 105 : Extension lésionnelle (en mm) des deux souches de souris au cours du suivi longitudinal IRM *in vivo* pondérée en T2. Les souris CX3CR1 (orange) et Aldh111 (bleu) ne présentent pas de différence significative en terme d'extension lésionnelle.

Les variations de mesure de l'extension lésionnelle proviennent certainement de la qualité de l'acquisition qui permet difficilement de déterminer clairement la première et la dernière coupe dans lesquelles on peut identifier la lésion.

Conclusion du suivi longitudinal *in vivo* en IRM pondérée en T2: La comparaison des souris CX3CR1 et Aldh111 à différents temps après la lésion n'a pas montré de différence significative en terme de volume lésionnel ou d'extension lésionnelle.

A 24 heures, deux souris CX3CR1 présentent un épicode lésionnel avec 100% de lésion et aucun tissu intègre, ce qui pourrait correspondre à une section médullaire complète. Cependant, nous avons choisi de conserver ces deux animaux ; lors de l'imagerie à une semaine, il s'est avéré que l'interprétation initiale (à 24 heures) était faussée par un hypersignal recouvrant la totalité du volume. En effet, à 1 semaine post lésion le pourcentage lésionnel a été mesuré à un niveau correspondant bien à une hémisection, soit 55-60% (Fig. 106). De plus, nous avons parfois observé chez certaines souris des symptômes proches d'une paraplégie complète peu de temps après la chirurgie, puis les symptômes « normaux » d'une monoplégie sont apparus quelques temps après. L'hypersignal mesuré et les symptômes de paraplégie complète sont probablement dus à l'œdème, qui comprime la moelle épinière du côté sectionné comme du côté préservé.

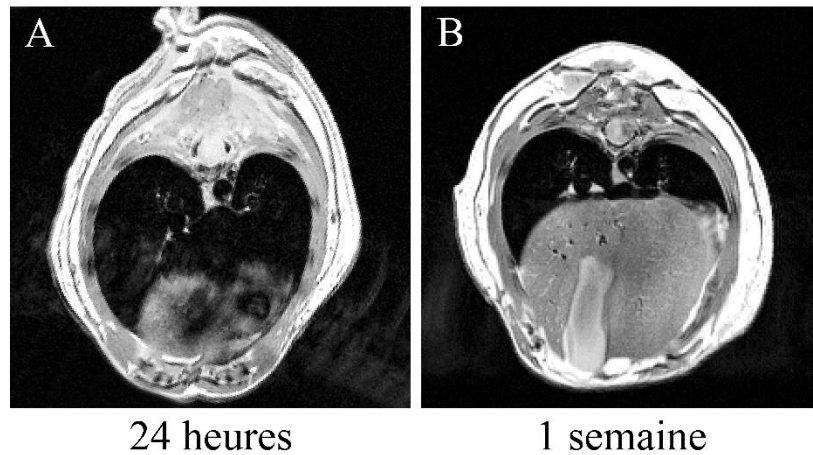


Figure 106: IRM *in vivo* pondérée T2 présentant l'épicentre de la lésion, effectuée à 24 heures (A) et à 1 semaine de la lésion (B) de la même souris CX3XR1.

Il faut prendre en compte la surestimation de la lésion au moment de l'imagerie initiale lorsqu'on effectue la comparaison statistique des points initiaux avec les points plus tardifs de l'étude. En effet, l'étude de l'évolution de la lésion au cours du temps pourrait être biaisée par le fait que l'évaluation initiale montre, de façon erronée, une transection de la moelle épinière. Le fait de quantifier la lésion à 100% à 24h pourrait être dû à l'œdème vasogénique post-lésionnel. En effet, une augmentation de la concentration en eau dans la zone lésée et ses alentours entraîne une hausse du signal en pondération T2. Plusieurs études décrivent ce genre de difficulté d'identification, avec une perte de contraste entre les régions de la moelle épinière à des temps proches du temps lésionnel (Bilgen et al. 2007). De manière générale, en pondération T2, les hypersignaux reflètent une combinaison de démyélinisation, d'inflammation et d'œdème tandis que les hyposignaux reflètent les zones hémorragiques (Bilgen et al. 2000).

Wamil et son équipe ont été parmi les premiers à fournir une description IRM *in vivo* de la moelle épinière lésée 21 jours après une lésion et à comparer les résultats avec des marquages histologiques (Wamil, and Hellervqvist 1998). Par la suite, d'autres équipes se sont intéressées à l'IRM *in vivo* à des temps post-lésionnels variables, allant de 3 heures (Kim et al. 2010), 1 jour (Bonny et al. 2004), jusqu'à 2 semaines (Kim et al. 2007) chez la souris C57Bl/6. Bilgen et collègues ont été les premiers à réaliser un suivi longitudinal en IRM *in vivo* sur un appareil 9.4T avec une analyse quantitative de la moelle épinière lésée sur la souris C57Bl/6 jusqu'à 4 semaines après la lésion (Bilgen et al. 2007). Nous avons précédemment rapporté que l'IRM *in vivo* pondérée en T2 permet la discrimination du volume de la lésion entre les différentes sévérités de la lésion (hémisection et transection) de 72 heures jusqu'à 6 semaines après la lésion

chez la souris Swiss (Noristani et al. 2015). Nous observons maintenant que l'augmentation du volume lésionnel est maximale chez les deux souches de souris dans la semaine suivant la lésion, ce qui reflète probablement l'œdème vasogénique primaire résultant d'une rupture de la barrière hémato-encéphalique induite par la lésion et de la fuite de plasma dans la zone lésionnelle. L'IRM longitudinale *in vivo* pondérée en T2 n'a montré aucune différence de volume de lésion entre les deux souches de souris jusqu'à 6 semaines après la lésion.

3.4 Utilisation de l'IRM *ex vivo* pondérée en T2 et de l'histologie : comparaison des souris CX3CR1 et Aldh111

Nous avons choisi de compléter l'étude *in vivo* par une analyse plus poussée du volume lésionnel en utilisant l'IRM *ex vivo* pondérée en T2, qui permet d'obtenir une meilleure résolution et de confirmer ou d'infirmer les conclusions faites précédemment. Pour cela, à la suite de l'IRM *in vivo*, 6 semaines après la chirurgie, les souris sont euthanasiées et leurs moelles épinières sont disséquées. Les moelles épinières sont placées dans un tube en verre fixé au banc d'anesthésie afin de pouvoir scanner l'échantillon avec l'antenne RF43 utilisée en *in vivo* (2.5.2).

3.4.1 Qualité du signal en IRM *ex vivo* pondérée en T2

Pour évaluer le signal obtenu avec les paramètres IRM *ex vivo* choisis, 12 images provenant des 12 animaux scannés 6 semaines après la chirurgie sont utilisées pour évaluer le signal, au niveau de l'épicentre.

En moyenne, sur 12 images en IRM *ex vivo* pondérée en T2, le SNR est de **11.98 ± 0.56**. C'est assez surprenant que la valeur de SNR soit plus faible en IRM *ex vivo*, puisque nous ne sommes quasiment pas contraints par le temps (l'acquisition durait 14 heures environ), et que 180 accumulations du signal sont effectuées. Cette différence s'explique néanmoins par une hausse de 400% du bruit entre les acquisitions *in vivo* (539 ± 29, UA) et *ex vivo* (2661 ± 16).

<i>Signal sur bruit</i>	Substance grise	Substance blanche	Lésion
SNR	14.63 ± 0.89	10.70 ± 0.57	10.62 ± 0.98

Tableau 13 : Signal sur bruit des différentes régions de la moelle épinière en IRM *ex vivo* pondérée T2.

Dans le cas de l'IRM *ex vivo* pondérée T2, la lésion apparaît en hyposignal par rapport à la substance grise et en très léger hyposignal par rapport à la substance blanche. Le SNR est très satisfaisant (minimum 10) en regard de la très forte augmentation du bruit par rapport à l'IRM

in vivo. Il est en effet nécessaire de prendre en compte le bruit pour évaluer le CNR et surtout pour pouvoir effectuer la comparaison avec le CNR obtenu en *in vivo*.

Nous retrouvons à nouveau le contraste le plus important entre la substance grise et la lésion (CNR=4.01). Les intensités de signaux entre la substance blanche et la zone lésée sont très proches (CNR=1.35), ce qui laisse à penser qu'il est difficile de discriminer la substance blanche lésée de la substance blanche préservée en IRM *ex vivo* pondérée T2. Notons que la substance grise est plus facile à discriminer de la substance blanche en IRM *ex vivo* (CNR=3.92) qu'en IRM *in vivo* (CNR=3.31).

<i>Contraste sur bruit</i>	Substance grise / Substance blanche	Substance grise / Lésion	Substance blanche / Lésion
CNR	3.92 ± 0.46	4.01 ± 0.54	1.35 ± 0.46

Tableau 14 : Contraste sur bruit des différentes régions de la moelle épinière en IRM *ex vivo* pondérée T2.

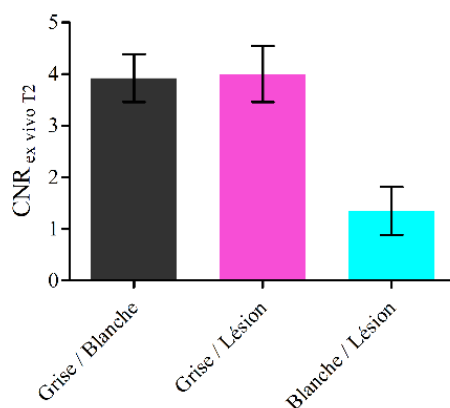


Figure 107 : CNR mesuré sur les IRM *ex vivo* pondérée T2.

3.4.2 Quantification de la lésion en IRM *ex vivo* pondérée en T2

A la suite de l'IRM *in vivo* pondérée T2, les animaux sont sacrifiés, les moelles prélevées, et une IRM *ex vivo* pondérée T2 est effectuée. L'analyse est faite sur 60 images transversales de 0.6 mm d'épaisseur, sur un segment de 3.6 cm centré sur l'épicentre de la lésion. La segmentation est effectuée manuellement en déterminant les zones préservées et les zones lésées sur l'ensemble des images (Fig. 108).

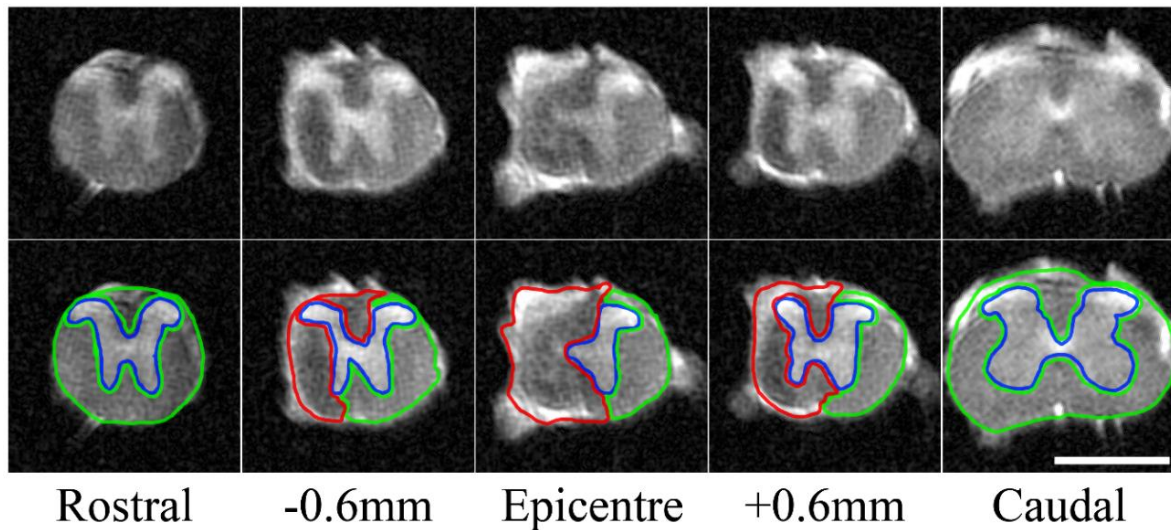


Figure 108 : IRM *ex vivo* pondérée T2 obtenue avec l'antenne RF43. 60 coupes transversales de 0.6 mm d'épaisseur permettent d'effectuer l'analyse sur l'axe rostro-caudal de la moelle épinière et de quantifier le pourcentage lésionnel, le volume lésionnel et l'extension lésionnelle. Echelle : 1.5mm.

Comme présenté dans la Figure 109, en comparant la moyenne des pourcentages de tissus lésé à l'épicentre entre les deux souches à 6 semaines, aucune différence significative n'est observée (Wilcoxon). De même il n'y a pas de différence lorsque l'on compare l'extension lésionnelle entre les souches.

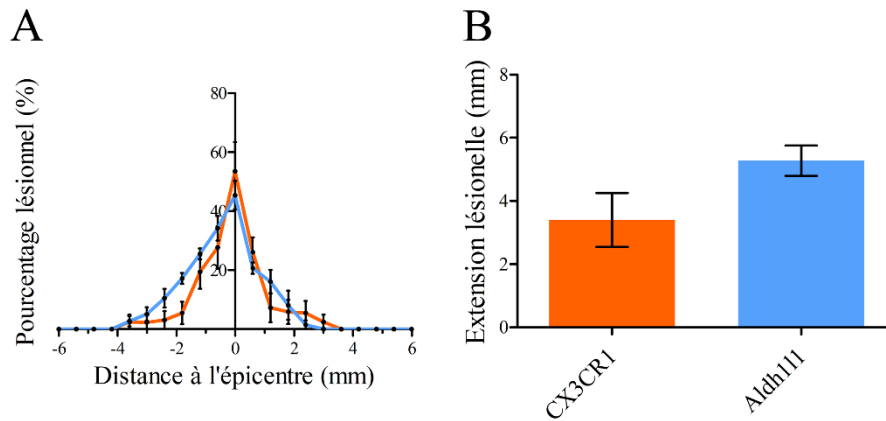


Figure 109 : Quantification du pourcentage lésionnel (A) et de l'extension lésionnelle (B) 6 semaines après la chirurgie des souris CX3CR1 (courbe orange) et des souris Aldh111 (courbe bleue) en utilisant l'IRM ex vivo pondérée T2. Les souris analysées en ex vivo sont les 12 animaux qui ont été suivis en IRM in vivo de 24 heures à 6 semaines après la lésion.

L'analyse du volume lésionnel, exprimé en aire sous la courbe, n'a pas montré de différence entre les souches (Tab. 15).

Volume lésionnel	6 semaines
Aldh111 AUC	112.3 ± 8.81
CX3CR1 AUC	96.7 ± 19.54

Tableau 15 : Aires sous la courbe (AUC) et volumes obtenus en IRM ex vivo pondérée en T2 correspondant à la quantification du volume lésionnel sur l'axe rostro-caudal.

L'évaluation de la lésion est effectuée grâce à l'IRM *ex vivo* qui présente une meilleure résolution sachant que le temps d'acquisition n'est pas limité par la durée d'anesthésie. Nous pouvons émettre un doute sur la fiabilité de l'identification de la lésion avec ce protocole très couteux en temps, et qui de plus ne permet pas de discriminer facilement la substance blanche de la lésion (CNR=1.35). Nous avons néanmoins observé que, comme pour l'IRM *in vivo*, aucune différence significative n'a été trouvée entre les deux souches de souris. Afin de confirmer les informations obtenues en IRM, nous avons choisi de faire une analyse plus classique avec l'évaluation histologique du volume lésionnel et de l'extension lésionnelle.

3.4.3 Quantification de la lésion en histologie

Les moelles épinières des 12 souris tout d'abord suivies longitudinalement en IRM *in vivo* puis analysées en IRM *ex vivo* sont préparées pour l'histologie en faisant des coupes de 14µm d'épaisseur au cryostat. Pour comparer à nos résultats d'IRM *in vivo* à des temps post lésionnels plus court, des groupes d'animaux sont ajoutés pour l'analyse histologique. Les quantifications du volume et l'extension de la lésion sont effectuées à 24 et 72 heures, 1, 2 et 4 semaines après la lésion.

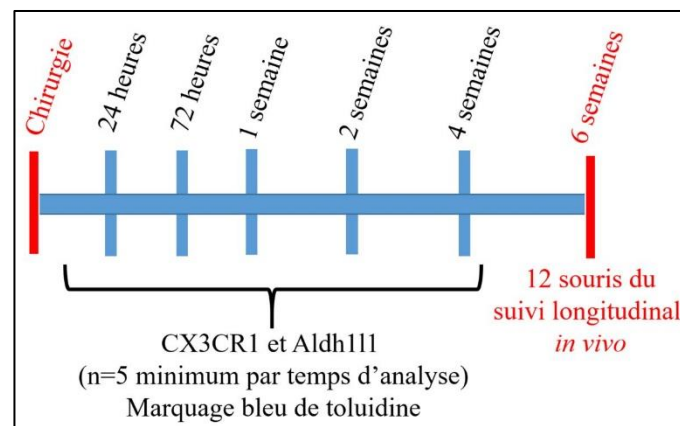


Figure 110 : Temps de mesures du volume lésionnel avec des marquages au bleu de toluidine.

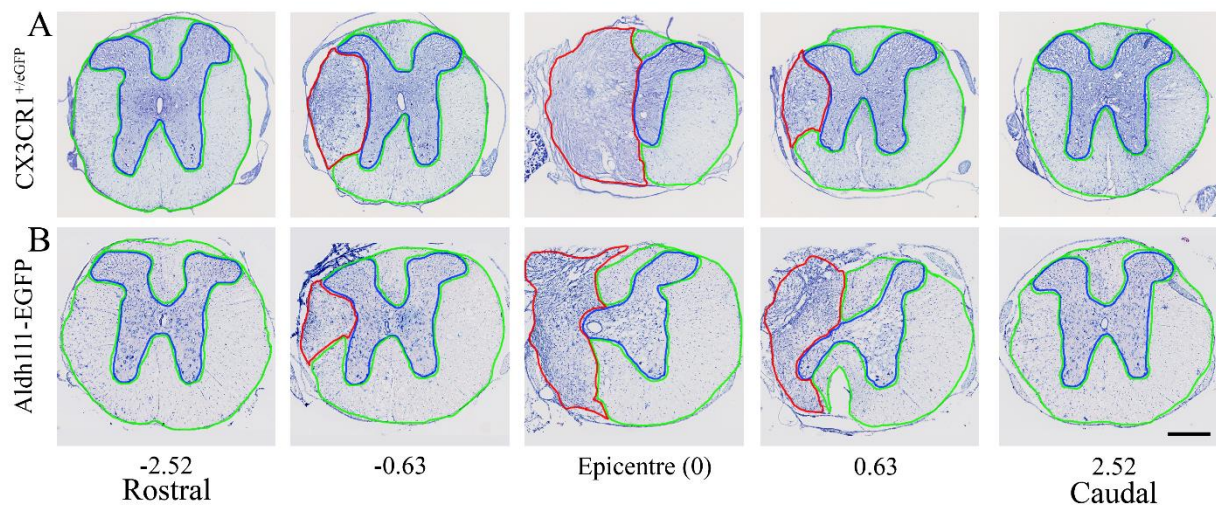


Figure 111 : Marquage au bleu de toluidine effectué de 24h à 6 semaines après la chirurgie sur des souris CX3CR1 (A) et Aldh11 (B). Une vingtaine de coupes transversales de 14µm d'épaisseur permettent d'effectuer l'analyse sur l'axe rostro-caudal de la moelle épinière et de quantifier le pourcentage lésionnel, le volume lésionnel et l'extension. Echelle (A-B) : 500µm.

En faisant un marquage au bleu de toluidine sur les sections de moelle épinière, nous avons choisi d'utiliser une méthode plus « classique » pour quantifier la lésion et comparer aux résultats obtenus avec l'IRM. Dans la moelle épinière intacte, la coloration au bleu de toluidine marque principalement les neurones dans la matière grise. Dans la moelle épinière lésée, il y a une forte densité de petites cellules positives au bleu de toluidine dans les substances grise et blanche (Fig. 111). La coloration au bleu de toluidine permet donc une identification claire du site de la lésion et du tissu fibreux à faible grossissement, avec, en particulier, un grand nombre de cellules positives au bleu de toluidine et de zones de cavitation.

Les quantifications du pourcentage lésionnel ne révèlent aucune différence significative entre les souris CX3CR1 et Aldh111 tout au long des 6 semaines suivant la chirurgie (Fig. 112 et Tab. 16). D'autres études histologiques n'ont également pas trouvé de différence dans le volume lésionnel entre les souris C57BL/6, C57BL/10, BALB/c et B10.PL malgré des variabilités évidentes en terme de récupération fonctionnelle après une LME (Basso et al. 2006; Kerr and David 2007; Kigerl, McGaughy, and Popovich 2006).

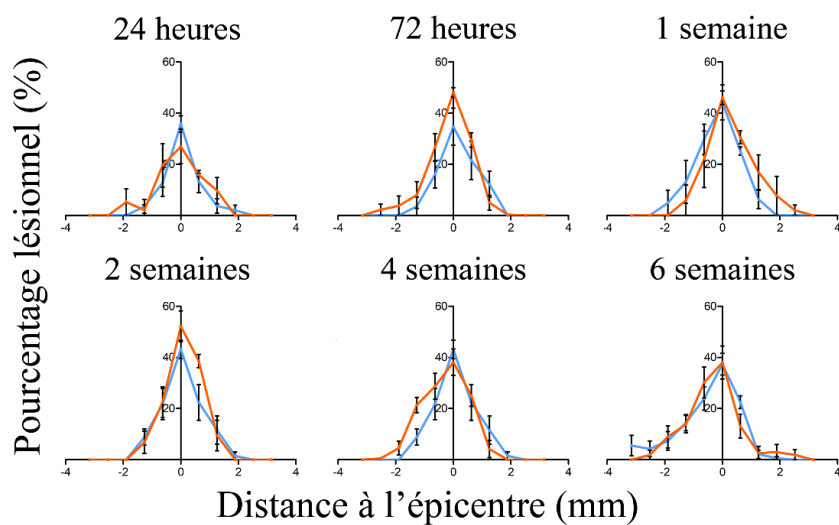


Figure 112 : Quantification du pourcentage lésionnel (A) et de l'extension lésionnelle 6 semaines après la chirurgie des souris CX3CR1 (courbe orange) et des souris Aldh111 (courbe bleue) en utilisant l'IRM ex vivo pondérée T2.

AUC	24 heures	72 heures	1 semaine	2 semaines	4 semaines	6 semaines
Aldh111	45 ± 6	55 ± 13	78 ± 11	69 ± 9	69 ± 9	73 ± 10
CX3CR1	50 ± 5	78 ± 8	83 ± 6	82 ± 7	77 ± 7	72 ± 12

Tableau 16 : Aires sous la courbe (AUC) obtenues en coloration au bleu de toluidine correspondant à la quantification du volume lésionnel sur l'axe rostro-caudal.

Conclusion : Ces données démontrent l'absence de différence dans l'évolution de la lésion entre les souris CX3CR1 et Aldh111 en utilisant l'IRM longitudinale *in vivo* et *ex vivo* pondérée en T2 ainsi que par des analyses histologiques.

3.4.4 Comparaison des observations faites en IRM *in vivo* pondérée en T2, en IRM *ex vivo* pondérée en T2 et en histologie

Nous avons comparé les mesures de la lésion faites en utilisant les 3 modalités d'analyses, à savoir l'IRM pondérée en T2 *in vivo* (Fig. 104), l'IRM pondérée en T2 *ex vivo* (Fig. 109) et les données histologiques du marquage au bleu de toluidine (Fig. 115). Les données comparées proviennent du groupe de souris ayant suivi l'IRM longitudinale *in vivo* (n=12). La comparaison des modalités a donc été effectuée sur les deux souches de souris 6 semaines après la chirurgie (Fig. 113).

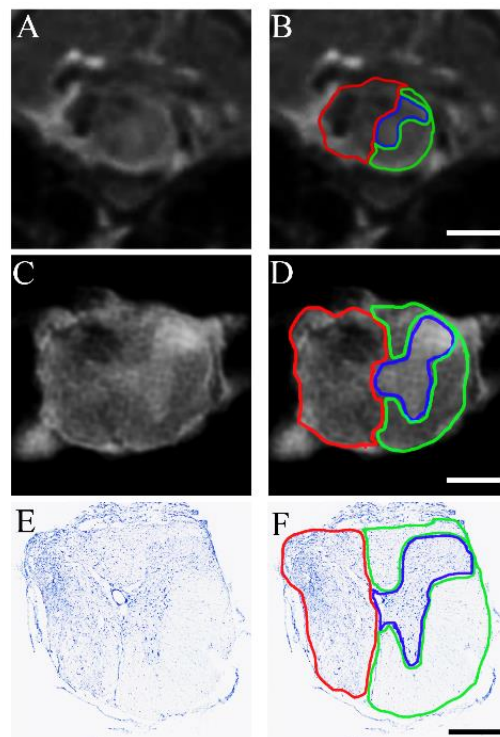


Figure 113 : Comparaison de la lésion 6 semaines après la lésion évaluée avec l'IRM *in vivo* (A&B), l'IRM *ex vivo* (C&D) et l'histologie (E&F). La manière de segmenter est présentée pour les 3 modalités (B, D & F).

Echelle (A-B) : 600 μ m, (C-D) : 400 μ m, (E-F) : 300 μ m.

L'analyse du pourcentage lésionnel ne montre aucune différence entre les 3 méthodes d'analyses chez les souris Aldh111 (Fig. 114A) et CX3CR1 (Fig. 114B). L'extension de la lésion le long de l'axe rostro-caudal, la zone de la lésion à l'épicentre et le volume de la lésion sont également semblables entre les deux souches de souris.

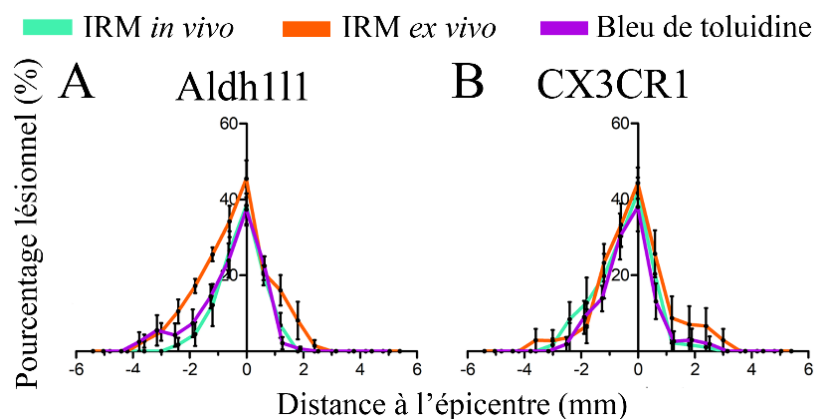


Figure 114 : Comparaison quantitative de la zone lésée des mêmes moelles épinières avec l'IRM *in vivo* pondérée en T2 (vert clair), IRM *ex vivo* pondérée en T2 (orange) et bleu de toluidine (violet) pour les souris Aldh111 (A) et CX3CR1 (B).

Etant donné que l'absence de différence entre les modalités ne permet pas « *stricto sensus* » de prouver le fait qu'elles soient identiques, nous avons procédé à des tests de corrélation de Spearman.

Le Tableau 17 présente les résultats de l'analyse de corrélation non-paramétrique utilisant le coefficient de corrélation de Spearman (r_s). Nous observons une forte corrélation entre l'IRM *in* et *ex vivo* (r_s **0.940** pour Aldh111 et **0.946** pour CX3CR1). De même, une forte corrélation est démontrée entre les analyses IRM *in vivo* et histologiques (r_s **0.956** pour Aldh111 et **0.969** pour CX3CR1). La corrélation la plus élevée a été trouvée entre l'IRM *ex vivo* et l'analyse histologique de la même moelle épinière (r_s **0.968** pour Aldh111 et **0.975** pour CX3CR1).

Corrélation	Aldh111	CX3CR1
<i>In vivo</i> / <i>Ex vivo</i>	0.940	0.946
<i>In vivo</i> / Bleu de toluidine	0.956	0.969
<i>Ex vivo</i> / Bleu de toluidine	0.968	0.975

Tableau 17 : Analyse de corrélation non-paramétrique: coefficients de corrélation de Spearman (r_s) entre les modalités (IRM *in* & *ex vivo*, IRM *in vivo* et bleu de toluidine et IRM *ex vivo* et bleu de toluidine).

Conclusion : ces résultats démontrent que 6 semaines après une hémisection médullaire latérale, il n'y a pas de différence dans la quantification de la zone lésionnelle entre l'IRM T2 *in vivo*, l'IRM T2 *ex vivo* et l'histologie. De plus de fortes corrélations entre les trois modalités sont observées. Nous pouvons désormais affirmer que la quantification des tissus endommagés est aussi précise en utilisant l'IRM qu'en utilisant l'histologie dite « classique » qui est par ailleurs plus demandante en temps d'acquisition et d'analyse.

3.5 Amélioration de l'IRM *ex vivo* pondérée en T2 avec une antenne dédiée

Cette partie vise à évaluer le gain ou la perte de signal induit par l'utilisation d'une antenne commerciale RF43 ou d'une antenne dédiée à l'étude des LME (appelée SolCoil) que nous avons mis au point. Les images *ex vivo* pondérées en T2 acquises avec l'antenne dédiée ont été utilisées dans l'étude visant à comparer les deux souches de souris de 72 heures à 3 mois avec des images pondérées en T2 et en diffusion. Les souris proviennent de groupes supplémentaires, composés de minimum 5 souris par souche et par temps d'analyse post-lésionnel.

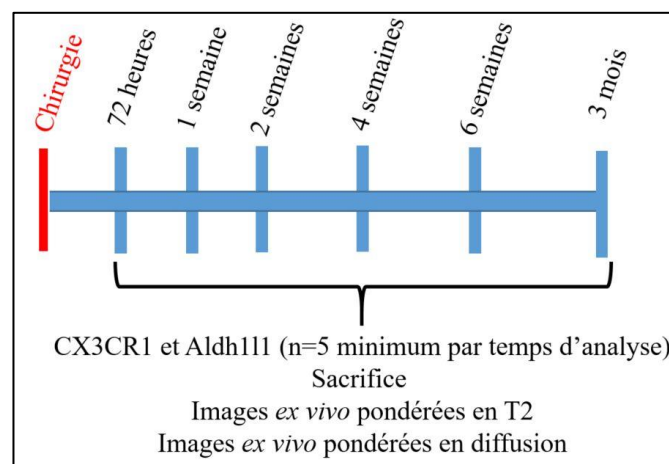


Figure 115: Analyse IRM des souris CX3CR1 et Aldh111. Les groupes de souris de 72 h à 3 mois ont été ajoutés pour effectuer une comparaison à chaque temps d'analyse entre les souches et entre les séquences T2 et diffusion.

3.5.1 Qualité du signal en IRM *ex vivo* pondérée en T2 avec l'antenne dédiée

Pour évaluer le signal obtenu avec les paramètres IRM *ex vivo* choisis, 14 images au niveau de l'épicentre provenant de 14 souris scannées 6 semaines après la chirurgie sont utilisées.

En moyenne, sur 14 images *ex vivo* pondérée en T2, le SNR avec l'antenne dédiée est de **25.45 ± 1.60**. On retrouve logiquement un SNR moyen (sur les différentes régions d'intérêts) plus important que lorsqu'on utilise l'antenne commerciale RF43 (**11.98 ± 0.56**). La comparaison des SNR mesurés avec la RF43 et l'antenne dédiée révèle d'ailleurs une différence significative (t-test non pairé, p-value < 0.0001, ***). Cette différence s'explique par une diminution de **160%** du bruit entre les acquisitions RF43 (2661 ± 16) et SolCoil (1025 ± 17).

<i>Signal sur bruit</i>	Substance grise	Substance blanche	Lésion
SNR	31.00 ± 3.04	24.72 ± 2.55	20.64 ± 2.10

Tableau 18 : Signal sur bruit des différentes régions de la moelle épinière en IRM *ex vivo* pondérée T2 en utilisant l'antenne « SolCoil »

Avec l'IRM *ex vivo* pondérée en T2, le tissu lésionnel apparaît en hyposignal par rapport à la substance grise et à la substance blanche. Le SNR avec l'antenne dédiée est multiplié au minimum par deux par rapport aux acquisitions effectuées avec la RF43. Le CNR est donc plus important, ceci permettant une meilleure discrimination des tissus sains et des tissus lésés. Toutefois, nous observons une augmentation de l'erreur standard à la moyenne (SEM) lorsqu'on utilise l'antenne dédiée. Cela s'explique par la sensibilité accrue d'une antenne « à façon » par rapport à une antenne commerciale. De plus, le signal provenant de la bobine solénoïde présente des fluctuations de magnitude, qui sont attribuées à l'espacement entre les spires (Coillot et al. 2016).

Critère	Pondération en T2 – RF43	Pondération en T2 – Antenne dédiée
TR (ms)	1155	1155
TE (ms)	14	14
NE	1	1
AVG	180	20
Résolution	256x256	256x256
Résolution spatiale (µm²)	40x40	40x40
FOV (mm)	10x10	10x10
Nbr. Coupes	60	60
Epaisseur (mm)	0.6	0.6
Gap (mm)	0	0
Temps de scan (h)	14h45	1h38

Tableau 19 : Paramètres des séquences pondérées en T2 avec les antennes RF43 et l'antenne dédiée

Nous retrouvons à nouveau le contraste le plus important entre la substance grise et la lésion (CNR=10.36). Les intensités de signaux entre la substance blanche et la zone lésée sont également assez éloignées (CNR=4.20).

<i>Contraste sur bruit</i>	Substance grise / Substance blanche	Substance grise / Lésion	Substance blanche / Lésion
CNR	6.28 ± 0.63	10.36 ± 1.15	4.20 ± 0.77

Tableau 20 : *Contraste sur bruit des différentes régions de la moelle épinière en IRM ex vivo pondérée T2 en utilisant l'antenne dédiée.*

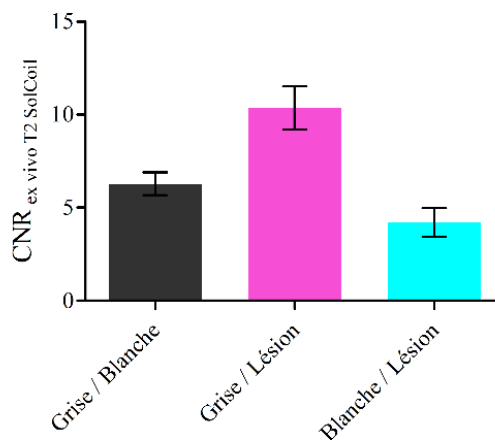


Figure 116 : *CNR mesuré sur les IRM ex vivo pondérées en T2 en utilisant l'antenne dédiée.*

La qualité du signal, et donc la résolution de l'image, dépend de la combinaison entre le champ magnétique fixe B0 et l'efficacité de l'antenne. La qualité de l'antenne dépend donc d'un compromis entre la taille de l'échantillon, la localisation de la région d'intérêt et l'homogénéité du champ magnétique. Pour imager la moelle épinière de souris (ou de microcèbe), le choix du design de l'antenne doit donc être adapté à la taille de l'échantillon, c'est-à-dire 4 cm de long pour maximum 3 mm de diamètre. La bobine de forme solénoïde semble être un choix pertinent pour la simplicité de la fabrication et pour des raisons d'efficacité (Hidalgo 2009) même si les rouleaux en forme de spire semblent être aussi approprié (Grant, Wu, and Opella 2010; Même et al. 2013). Le fil de ruban a été préféré au fil rond, pour des considérations d'homogénéité champ magnétique sur le volume de l'échantillon.



Figure 117: Photographie de la bobine solénoïde avec le fil en forme de ruban

Nous avons déjà effectué la comparaison entre l'antenne commerciale RF43 et l'antenne dédiée en imageant un tube d'eau et le SNR était environ 5 fois meilleur avec cette dernière (Coillot et al. 2016). Cette augmentation du SNR permet soit d'effectuer une acquisition plus rapide pour une résolution donnée, soit d'améliorer la résolution pour un temps d'acquisition donné. En effet, la quantité de signal nécessaire peut être obtenue avec un nombre d'acquisition de moyenne (AVG) plus faible.

Il n'y a pas de différence significative dans la discrimination entre les substances grise et blanche entre la RF43 et l'antenne dédiée. Cette absence de différence est bien illustrée lorsque l'on observe les images scannées avec les deux antennes (Fig. 119). Au contraire, pour l'identification des tissus lésés, l'utilisation de l'antenne dédiée améliore significativement l'analyse. La forte hausse du SNR induit une augmentation significative du CNR et donc une identification plus aisée des différentes régions de la moelle épinière lésée (Fig. 118).

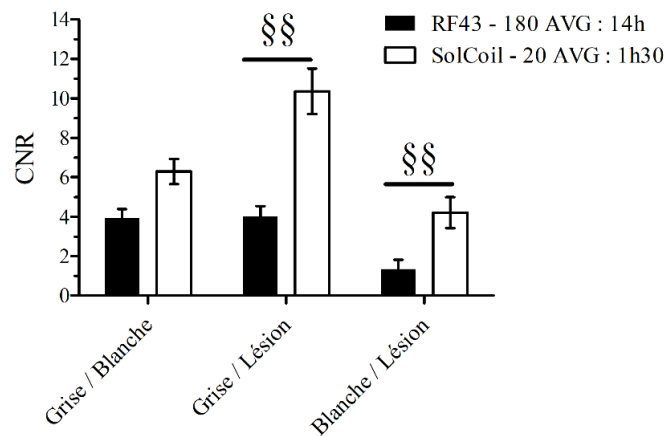


Figure 118 : CNR mesuré avec l'antenne RF43 (noir) et avec l'antenne SolCoil (blanc). Les moyennes comparées ne répondant pas toutes positivement au test de normalité de Shapiro-Wilk, le test de Wilcoxon a été préféré au t-test non-pairé de Student. §§ $p < 0.01$.

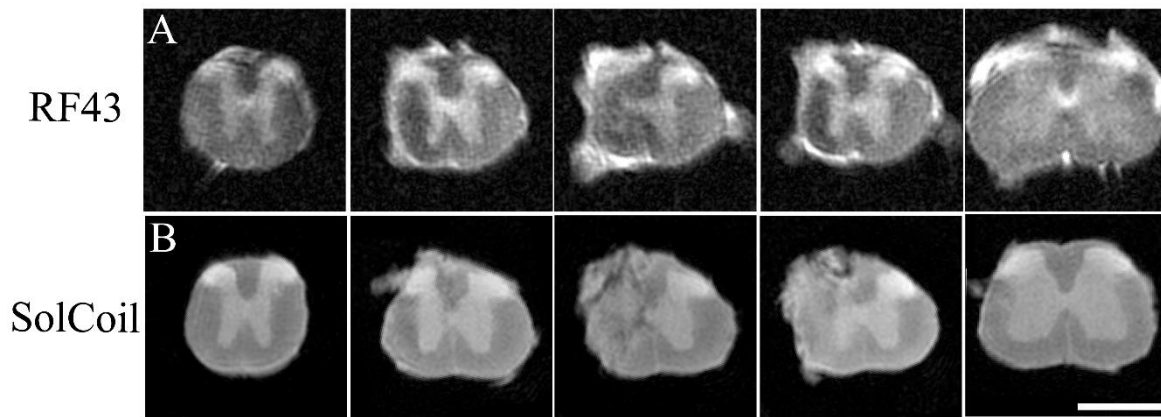


Figure 119 : IRM acquises sur l'axe rostro-caudal avec l'antenne commerciale RF43 (A) et avec l'antenne dédiée « SolCoil » (B). Echelle : 1.5mm.

3.5.2 Quantification de la lésion en IRM *ex vivo* pondérée en T2 en utilisant l'antenne dédiée

L'analyse est faite sur 60 images transversales de 0.6 mm d'épaisseur, sur un segment de 3.6 cm centré sur l'épicentre de la lésion. La segmentation est effectuée manuellement en déterminant les parties préservées et les parties lésées sur l'ensemble des images (Fig. 120).

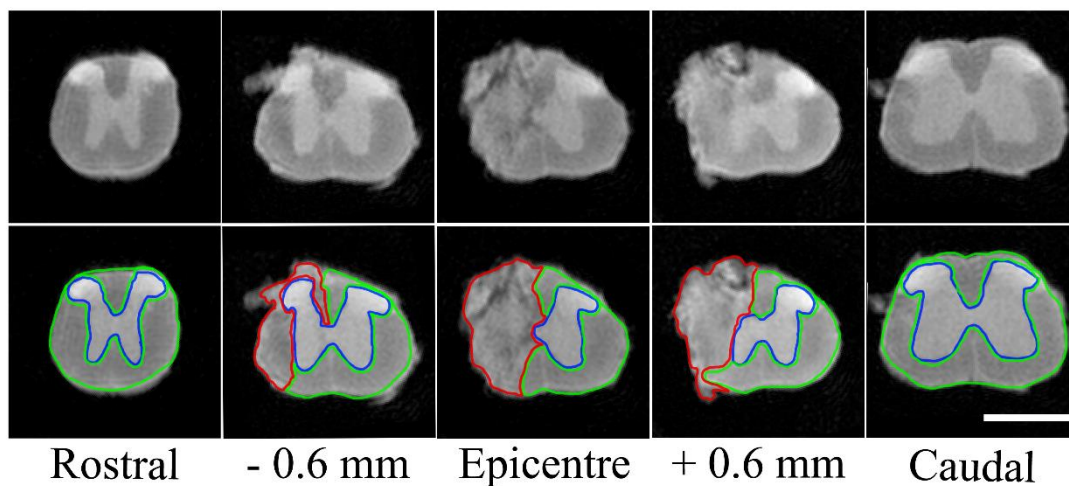


Figure 120 : IRM *ex vivo* pondérée en T2. 60 coupes transversales de 0.6 mm d'épaisseur permettent d'effectuer l'analyse sur l'axe rostro-caudal de la moelle épinière et de quantifier le pourcentage lésionnel, le volume lésionnel et l'extension de la lésion. Echelle : 1.5mm.

En utilisant l'antenne dédiée aux études sur la moelle épinière, les quantifications IRM du pourcentage et du volume lésionnel, ainsi que l'extension lésionnelle n'ont révélé aucune différence significative entre les souris CX3CR1 et Aldh111 tout au long des 3 mois suivant la chirurgie (Fig. 121).

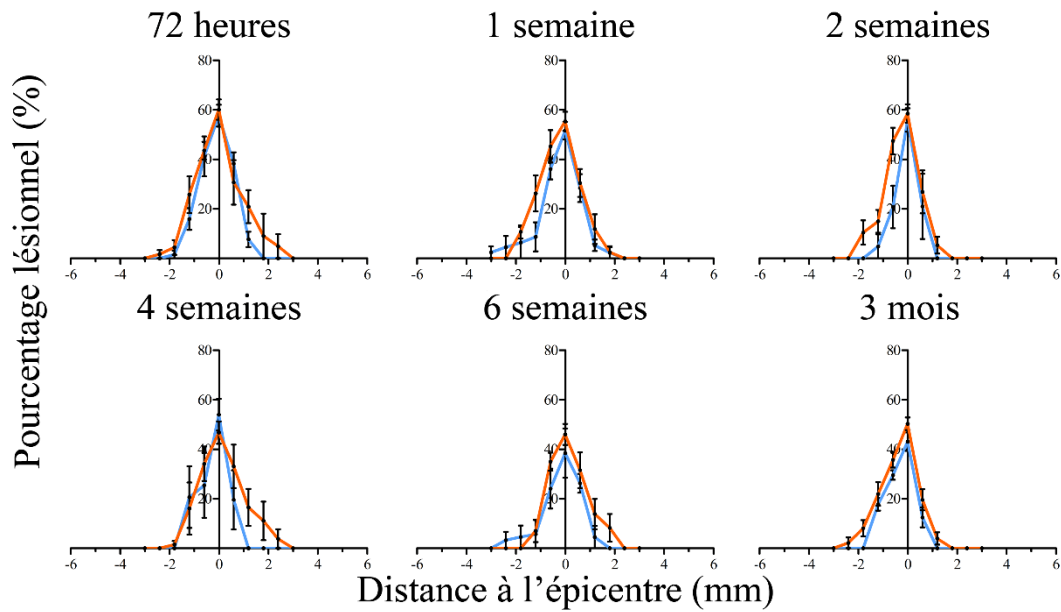


Figure 121 : Quantification longitudinale du pourcentage lésionnel de 72 heures à 3 mois après la chirurgie des souris CX3CR1 (courbe orange) et des souris Aldh111 (courbe bleue) en utilisant l'IRM *ex vivo* pondérée en T2 avec l'antenne dédiée. Les images ont été acquises avec l'antenne dédiée.

Conclusion : malgré un gain en signal et en contraste résultant de l'utilisation de l'antenne dédiée, la comparaison de la réponse post lésionnelle des souris CX3CR1 et Aldh11 effectuée avec l'IRM *ex vivo* pondérée en T2 de 72 heures à 3 mois après la lésion ne permet pas d'identifier une différence de volume lésionnel ou d'extension lésionnelle.

3.6 Utilisation de l'IRM *ex vivo* pondérée en diffusion : comparaison des souris CX3CR1 et Aldh111

Cette partie vise à évaluer l'utilisation de séquences pondérées en diffusion. En effet, nos études précédentes comportaient de l'IRM pondérée en T2, et l'un des objectifs principaux de la thèse est de démontrer une amélioration de l'identification de la lésion grâce à la pondération en diffusion des images. Les séquences pondérées ont été utilisées dans le cadre de la comparaison des souches, en comparant le volume lésionnel obtenu avec l'IRM *ex vivo* pondérée en T2 et en diffusion. La comparaison a été faite entre des images acquises uniquement avec l'antenne dédiée. Les images acquises avec l'antenne RF43 (3.5.2) n'ont pas été incluses dans la comparaison.

3.6.1 Qualité du signal en IRM *ex vivo* pondérée en diffusion

Pour évaluer le signal obtenu au niveau de l'épicentre avec les paramètres IRM *ex vivo*, 16 images provenant de 16 souris scannées 6 semaines après la chirurgie ont été utilisées. Sur les images analysées, le gradient de diffusion a été appliqué parallèlement aux axones, mettant en avant la différence de propriété des substances blanche et grise, mais aussi de la zone lésionnelle. Nous avons choisi de pondérer les images avec un facteur b de 500 s/mm².

En moyenne, sur 16 images *ex vivo* pondérée en diffusion, le SNR est de **33.16 ± 2.48**. Le SNR moyen (sur les différentes régions d'intérêts) est plus important que les images sont pondérées en T2 (**25.45 ± 1.60**). La pondération en diffusion provoque une chute de l'intensité du signal, il est donc surprenant d'observer un SNR global supérieur dans une séquence pondérée en diffusion. En effet, plus une molécule est mobile, plus le signal va chuter. La comparaison statistique du SNR moyen des images pondérées en diffusion et en T2 révèle une différence significative (t-test non pairé, p-value < 0.05,#). Cette différence s'explique partiellement par une diminution de 54% du bruit entre les images pondérées en T2 (1025 ± 17) et en diffusion (466 ± 8). La diminution du bruit est justifiée par le nombre d'accumulations (AVG) effectuées pour les deux protocoles. En effet, le bruit est proportionnel à $\frac{1}{\sqrt{AVG}}$ (Haacke), et la séquence pondérée en T2 compte 20 accumulations, contre 30 pour la séquence pondérée en diffusion.

<i>Signal sur bruit</i>	Substance grise	Substance blanche	Lésion
SNR	51.41 ± 3.39	27.92 ± 2.04	20.17 ± 2.59

Tableau 21 : Signal sur bruit des différentes régions de la moelle épinière en IRM *ex vivo* pondérée en diffusion.

Dans le cas de l'IRM *ex vivo* pondérée en diffusion, le tissu lésionnel apparaît en hyposignal par rapport à la substance grise et à la substance blanche. Le SNR des images pondérées en diffusion est plus grand que celui des images pondérées en T2 car il y a plus d'accumulations et donc moins de bruit et car le TR est plus long et il y a donc plus de signal.

Par rapport à la séquence IRM *ex vivo* pondérée en T2 :

- le SNR de la substance grise augmente de 40%
- le SNR de la substance blanche augmente de 12%
- le SNR de la zone lésionnelle diminue de 2%

Le CNR devrait être plus important en pondérant en diffusion les images, grâce à la diminution du bruit, mais aussi grâce aux propriétés intrinsèques de la substance grise (isotrope) et de la substance blanche (anisotrope).

Critère	Pondération en T2	Pondération en diffusion
TR (ms)	1155	1580
TE (ms)	14	30.55
NE	1	1
AVG	20	30
Résolution	256x256	128x128
Résolution spatiale (μm^2)	40x40	80x80
FOV (mm)	10x10	10x10
Nbr. Coupes	60	36
Epaisseur (mm)	0.6	1
Gap (mm)	0	0
Temps de scan (h)	1h38	1h41

Tableau 22 : Paramètres des séquences pondérées en T2 et en diffusion.

Il est important de noter dans le tableau 12 que le temps d'acquisitions des séances pondérées en diffusion a été calculé afin d'obtenir le même temps d'acquisition que les séquences pondérées en T2, soit 1h40 environ. L'obtention d'ADC nécessite bien entendu l'obtention d'une séquence identique, sans pondération en diffusion (facteur $b=0 \text{ mm}^2/\text{s}$).

Le contraste le plus important est obtenu entre la substance grise et la lésion (CNR=31.18). Nous observons un gain de « qualité » crucial dans la discrimination de la substance blanche préservée et du tissu lésé. En effet, les images pondérées en diffusion (CNR=9.29) permettent d’obtenir un CNR environ 2 fois plus important que les images pondérées en T2 (CNR=4.20).

<i>Contraste sur bruit</i>	Substance grise / Substance blanche	Substance grise / Lésion	Substance blanche / Lésion
CNR	22.84 ± 1.63	31.18 ± 10.81	9.29 ± 1.81

Tableau 23 : Contraste sur bruit des différentes régions de la moelle épinière en IRM ex vivo pondérée en diffusion.

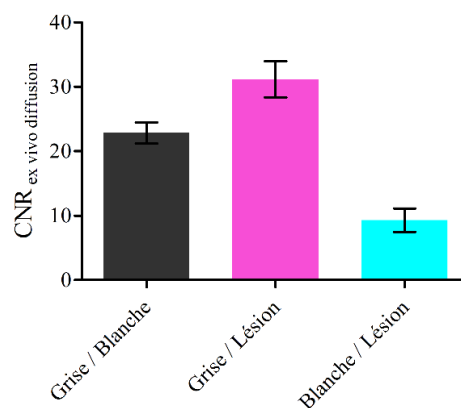


Figure 122 : CNR mesuré sur les IRM ex vivo pondérée en diffusion.

Donc, même si elle reste soumise à l’opérateur, l’identification de la lésion sera bien plus aisée en utilisant l’IRM pondérée en diffusion puisque la principale difficulté est de différencier les deux régions les plus proches en terme d’intensité de signal qui correspondent à la substance blanche et la lésion.

L’utilisation de la pondération en diffusion dans l’axe des axones améliore significativement l’analyse. L’augmentation significative du CNR entre toutes les régions des images pondérées en diffusion par rapport aux images pondérées en T2 permet une identification plus aisée des différentes régions de la moelle épinière lésée (Fig. 123).

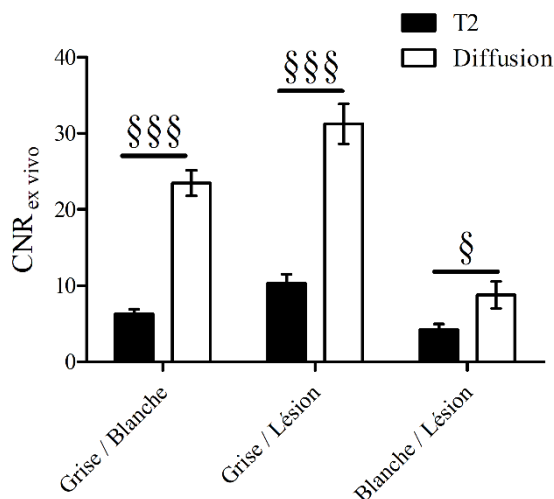


Figure 123 : CNR mesuré sur des images pondérées en T2 (noir) et en diffusion (blanc). Wilcoxon. § $p < 0.05$, §§§ $p < 0.001$.

3.6.2 Quantification de la lésion en IRM *ex vivo* pondérée en diffusion

En parallèle des images *ex vivo* pondérée en T2, les mêmes moelles épinières sont scannées avec le protocole pondéré en diffusion. L'analyse est faite sur 36 images transversales de 1 mm d'épaisseur, sur un segment de 3.6cm centré sur l'épicentre de la lésion. La segmentation est effectuée manuellement en déterminant les parties préservées et les parties lésées sur l'ensemble des images (Fig. 124).

Les évaluations quantitatives de la taille des lésions dans les deux souches de souris sont similaires en utilisant l'IRM pondérée en T2. Nous avons donc analysé les mêmes moelles épinières en IRM pondérée en diffusion afin profiter de l'amélioration de la sensibilité de détection. Le CNR entre les zones préservées et lésées des images pondérées en diffusion étant bien supérieur, l'analyse manuelle de la lésion est plus facile et surtout moins soumise à interprétation. Les images pondérées en diffusion permettent une plus grande précision dans la segmentation manuelle des différentes régions de la moelle épinière.

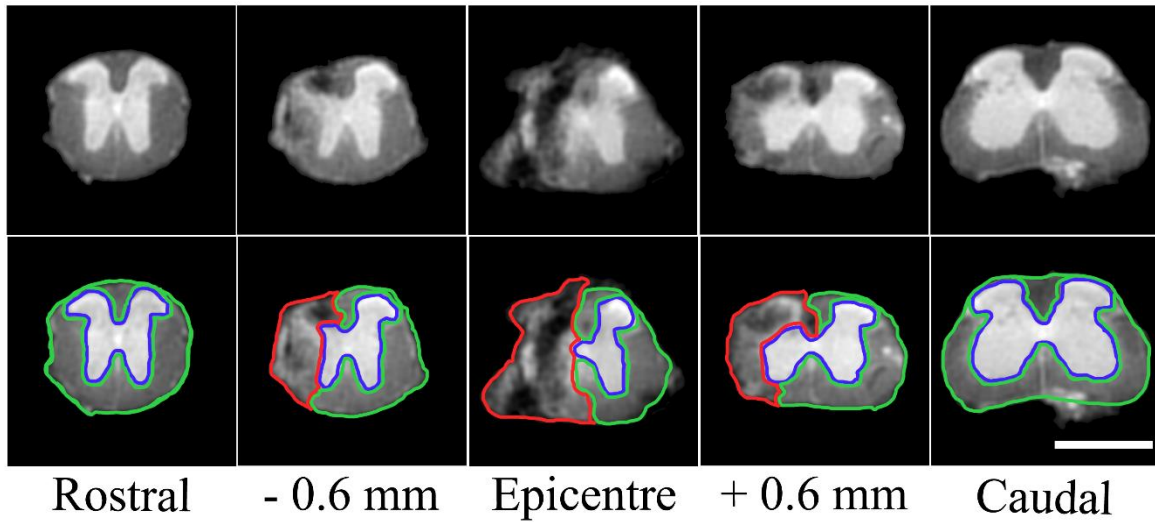


Figure 124 : IRM *ex vivo* pondérée en diffusion. 36 coupes transversales de 1 mm d'épaisseur permettent d'effectuer l'analyse sur l'axe rostro-caudal de la moelle épinière et de quantifier le pourcentage lésionnel, le volume lésionnel et l'extension de la lésion. Echelle : 1.5mm.

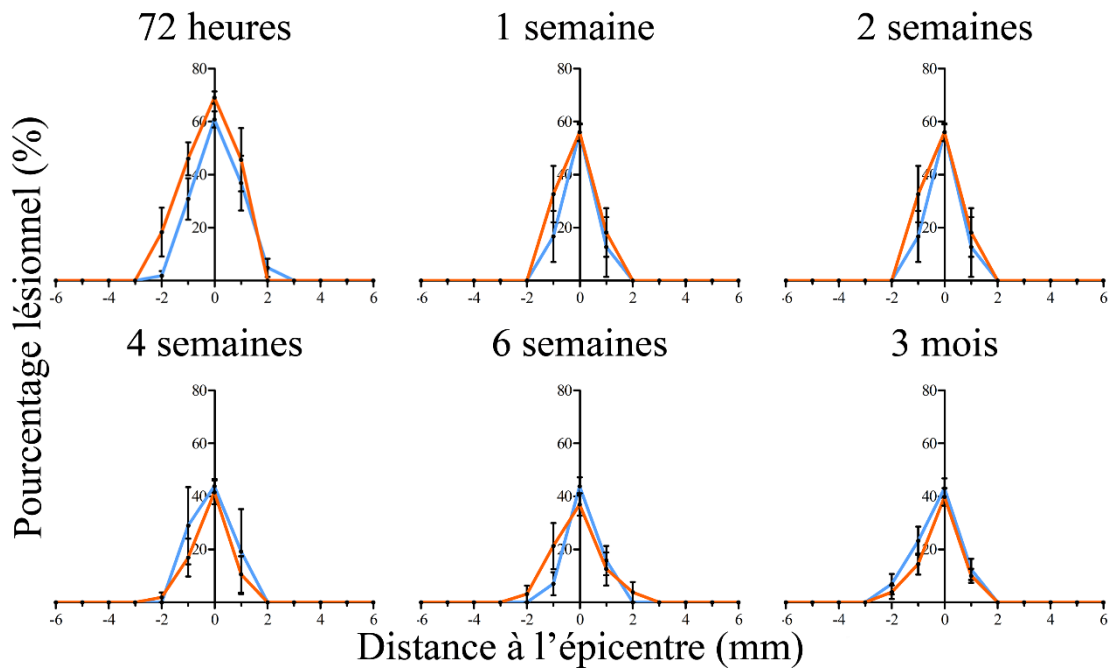


Figure 125 : Quantification longitudinale du pourcentage lésionnel de 72 heures à 3 mois après la chirurgie des souris *CX3CR1* (courbe orange) et des souris *Aldh111* (courbe bleue) en utilisant l'IRM *ex vivo* pondérée en diffusion. Les images ont été acquises avec l'antenne dédiée.

Le pourcentage de tissu lésé à l'épicentre de la lésion n'est pas le seul paramètre qui pourrait affecter la récupération fonctionnelle après une lésion médullaire, nous avons donc utilisé les images pondérées en diffusion pour analyser l'extension sur l'axe rostro-caudal (Fig. 126) et le volume lésionnel (Fig. 127) jusqu'à 3 mois.

Que ce soit en utilisant l'IRM pondérée en T2 ou en diffusion, l'extension de la lésion est similaire au cours du temps chez les deux souches de souris.

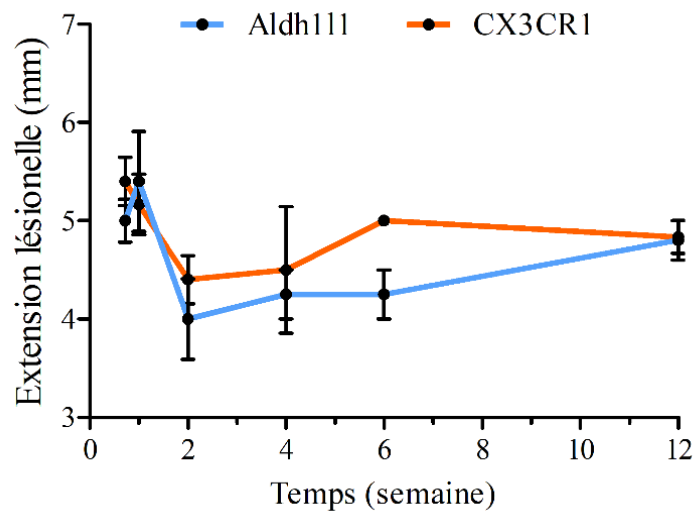


Figure 126 : Quantification de l'extension lésionnelle de 72 heures à 3 mois chez les souris Aldh111 (bleu) et CX3CR1 (orange).

Chez les souris Aldh111, le volume lésionnel moyen ne varie pas de manière significative au cours de la période de 3 mois après la chirurgie. Au contraire, les souris CX3CR1 présentent une diminution significative du volume moyen de la lésion entre 72 heures et 4 semaines, et entre 72 heures et 3 mois après la lésion (Fig. 127). En effet, 72 heures après la chirurgie, les volumes moyens de lésion, quantifiés grâce à l'aire sous la courbe, étaient de 179 ± 9 pour ensuite diminuer à 71 ± 12 à 4 semaines et à 68 ± 7 à 3 mois après la lésion. Nous avons choisi, pour plus de clarté d'exprimer l'évolution des aires sous la courbe en pourcentage de la valeur initiale du volume, à 72 heures. Les données de la figure 127 indiquent une diminution, pour les CX3CR1, allant jusqu'à 63% du volume lésionnel à 3 mois, par rapport à la valeur initiale à 72 heures.

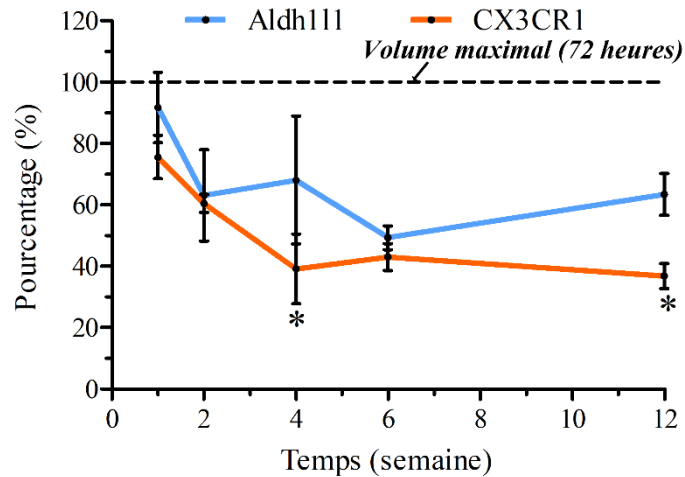


Figure 127 : Quantification du volume lésionnel en IRM ex vivo pondérée en diffusion sur l'axe rostro-caudal. Les aires sous la courbe ont été exprimées en pourcentage par rapport à la mesure initiale à 72 heures (trait en tiret noir). ANOVA 1 voie. * $p < 0.05$

Ce résultat confirme le rôle important de l'évolution rostro-caudal de la lésion et non pas uniquement du pourcentage de tissus lésé à l'épicentre.

Nous observons également une diminution au cours du temps du pourcentage lésionnel à l'épicentre uniquement chez les souris CX3CR1 (Fig. 128).

La notion d'évolution de la lésion au cours du temps est donc primordiale ; en effet la comparaison directe entre les souches à chaque temps post-lésionnels n'a pas permis d'identifier de différence significative pour l'ensemble des paramètres analysés.

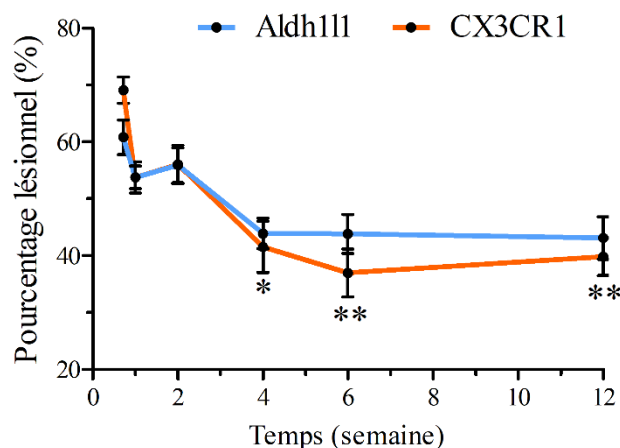


Figure 128 : Quantification de l'épicentre lésionnel de 72 heures à 3 mois chez les souris Aldh111 (bleu) et CX3CR1 (orange). ANOVA 1 voie. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

Nous avons montré précédemment que l'analyse au cours du temps (ANOVA 1 voie) des images IRM pondérées en T2 ne permet pas d'identifier une différence dans l'évolution de la lésion chez les deux souches de souris. Au contraire, il est possible de détecter une différence significative dans l'évolution de la lésion à l'épicentre chez les souris CX3CR1 en utilisant l'IRM pondérée en diffusion (Fig. 129, CX3CR1). Les souris CX3CR1 présentent en effet une diminution significative du pourcentage de tissu lésé à l'épicentre à partir de 4 semaines après la lésion atteignant $41 \pm 4.5\%$, $37 \pm 4.2\%$ et $41 \pm 3.6\%$ à 4, 6 semaines et 3 mois respectivement contre $69 \pm 2.3\%$ observés à 72 heures (Fig. 129). Au contraire, l'analyse quantitative en l'IRM pondérée en diffusion ne montre aucune différence dans l'évolution de la lésion à l'épicentre au cours du temps chez les souris Aldh111.

Dans la Figure 129, nous observons en effet une diminution du pourcentage lésionnel à l'épicentre seulement chez les souris CX3CR1 quand l'acquisition en IRM est pondérée en diffusion.

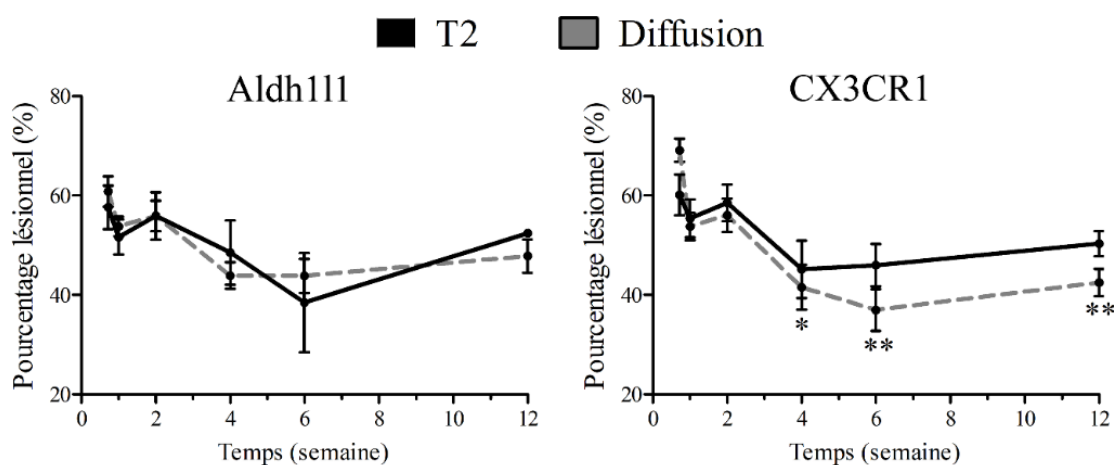


Figure 129 : Quantification de l'épicentre lésionnel en utilisant l'IRM pondérée en T2 (noir) et en diffusion (blanc).

3.6.3 Mise au point de la segmentation automatique et calcul de coefficient de diffusion apparent parallèle aux axones

La Figure 130 présente sur un exemple, le résultat de la procédure de segmentation automatique que nous avons développée sous l'environnement Matlab, pour les images en orientation axiale de la moelle épinière.

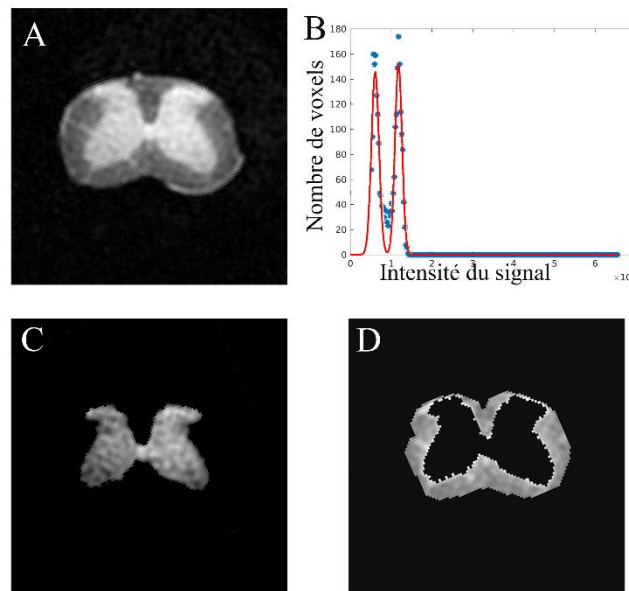


Figure 130 : Segmentation automatique des moelles épinières pour calculer les ADC//.

L'image de départ (Fig. 130A) correspond à une acquisition IRM avec une pondération de diffusion afin d'augmenter le contraste entre les substances grise et blanche. Une première croissance de région (méthode de Chan-Vese) est appliquée à partir du centre de la moelle épinière afin de déterminer grossièrement les contours des tissus. La distribution de l'intensité du signal RMN par voxel est calculée sur toute la moelle (Fig. 130B) et ajustée par la méthode des moindres carrés à l'aide de deux distributions Gaussiennes. Les paramètres d'ajustement : position, largeur à mi-hauteur et intensité sont ensuite injectés dans une deuxième croissance de région plus précise qui permet d'obtenir de manière plus fine les masques et les régions d'intérêts de la substance grise (Fig. 130C) et la substance blanche (Fig. 130D). Les masques sont stockés et peuvent ensuite être utilisés pour déterminer les distributions des coefficients de diffusion apparents sur les autres séries d'images pondérées T2 ou diffusion. La procédure que nous avons développée nécessite peu de paramétrisation initiale, ce qui rend le résultat robuste et indépendant de l'opérateur.

La segmentation automatique ne permet néanmoins pas de discriminer la zone de lésion des tissus préservés. L'objectif à terme est de programmer une routine permettant de sélectionner des régions anatomiques particulières et de donner une idée plus fine de la distribution de la diffusion sur l'ensemble de l'échantillon. La Figure 131 illustre la variation des coefficients de diffusion apparents parallèles dans la moelle épinière de souris lésée et souligne l'importance de traiter dans le futur des sous-régions et pas seulement comparer les régions substance grise/blanche, rostral/caudal. A l'heure actuelle, le programme segmente la substance grise et la substance blanche, et permet de générer un fichier contenant les valeurs de coefficient de diffusion apparent des deux régions pour les 36 coupes pondérées en diffusion.

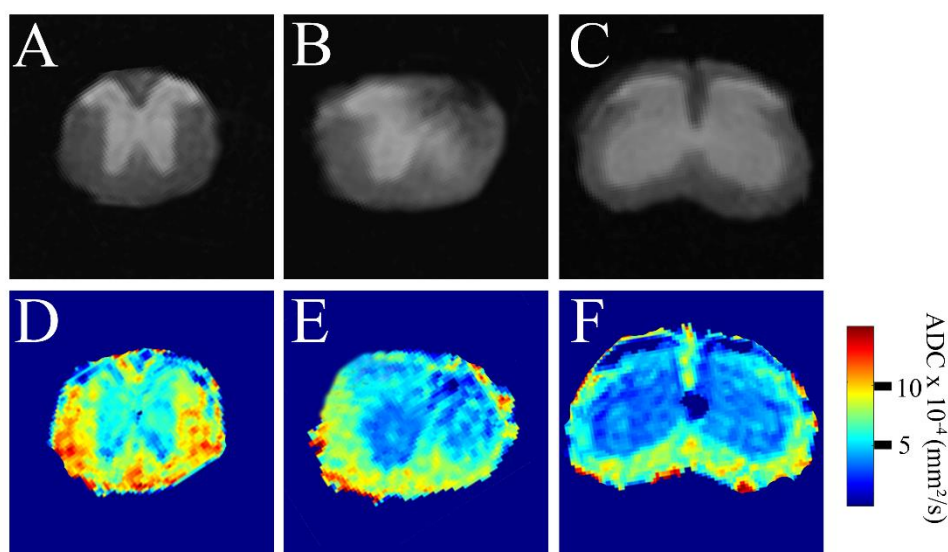


Figure 131 : Illustration de la répartition des ADC// rostral à la lésion (A&D) dans la lésion (B&E) et caudal à la lésion (C&F). Les ADC// sont obtenus sous Matlab à partir des images pondérées en diffusion (A-C).

La segmentation automatique est appliquée sur les 36 coupes des 90 échantillons de l'étude IRM pondérée en diffusion *ex vivo* afin d'obtenir les ADC// des souris Aldh111 et CX3CR1 (Fig. 132) et de les comparer au cours de temps, afin de potentiellement détecter une différence de réorganisation tissulaire. L'ADC// est en général associé à une intégrité axonale, en observant sa variation par rapport à un contexte sain. Les ADC// d'une souche de souris sont comparés aux valeurs dans un contexte sain de la même souche.

La quantification de l'ADC// de 72 heures à 3 mois a montré qu'après une lésion médullaire, il y a une diminution de la diffusion parallèle aux fibres pour les deux souches de souris, en localisation rostral et caudal à la lésion. Néanmoins, l'ADC// de la substance blanche est supérieur chez les souris CX3CR1 dès 72 heures et atteint même la valeur du contexte sain 3 mois après la chirurgie, dans la partie rostrale à la lésion. En effet, à 3 mois la diffusivité axiale

est différente entre les souris CX3CR1 et les Aldh111, puisqu'elle est de 14.02 et $12.57 \times 10^{-4} \text{mm}^2/\text{s}$, respectivement (Fig., 132A, t-test non apparié). La diffusivité axiale est également supérieure chez les CX3CR1 dans les parties caudales à la lésion, 4 semaines et 3 mois après la lésion (Fig. 132C). Bien qu'ils soient supérieurs chez les CX3CR1, les ADC// diminuent au cours du temps dans les parties caudales à la lésion chez les deux souches de souris.

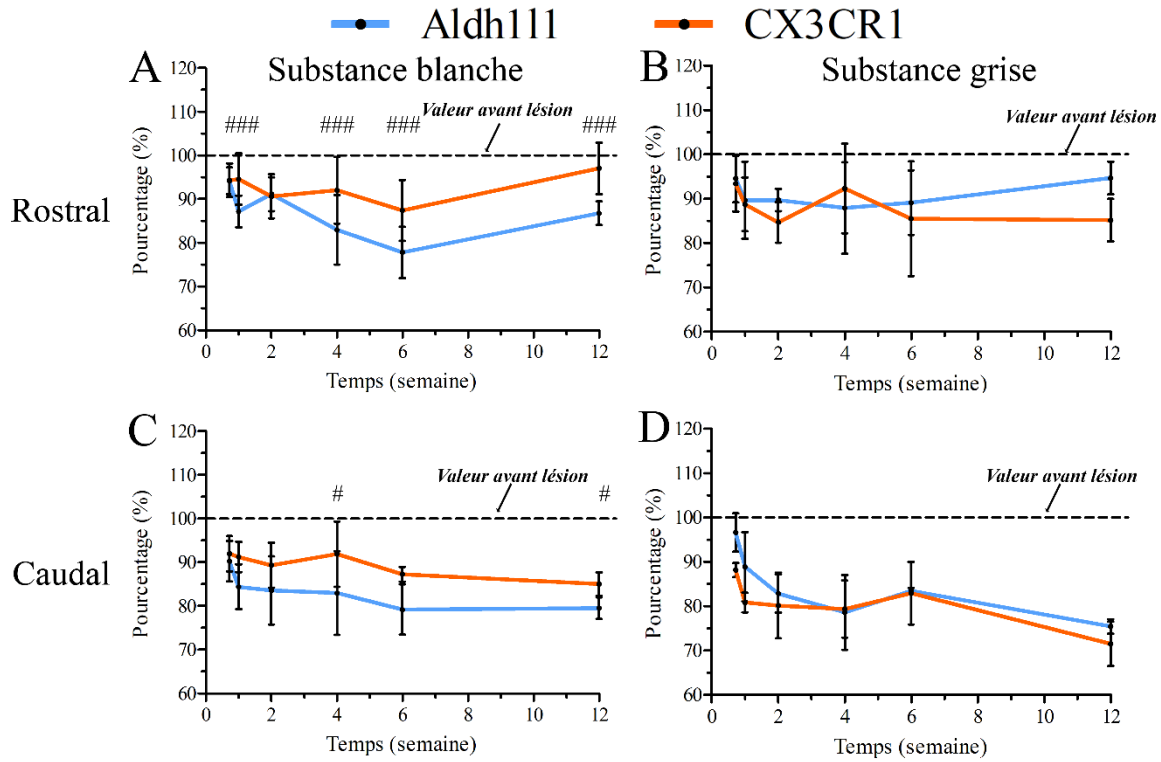


Figure 132 : Quantification de l'ADC// de 72 heures à 3 mois chez les souris Aldh111 (bleu) et CX3CR1 (orange). Les ADC// sont exprimés en pourcentage par rapport à la valeur avant la chirurgie. T-test : ###p < 0.001. (n=5 par groupe au minimum)

<i>ADC x 10⁻⁴ (mm²/s)</i>	Substance grise		Substance blanche	
	Aldh111	CX3CR1	Aldh111	CX3CR1
Non lésé	8.80	9.17	14.68	14.74
72 heures	8.41	8.29	13.76	13.69
1 semaine	7.94	8.01	12.77	13.91
2 semaines	8.24	7.70	13.30	13.18
4 semaines	7.93	8.71	12.57	13.55
6 semaines	7.68	8.09	11.01	13.34
3 mois	7.97	7.62	12.57	14.02

Tableau 24 : Valeurs d'ADC// dans la substance grise et blanche rostrale des souris Aldh1 et CX3CR1 de 72 heures à 3 mois après une lésion médullaire.

<i>ADC x 10⁻⁴ (mm²/s)</i>	Substance grise		Substance blanche	
	Aldh111	CX3CR1	Aldh111	CX3CR1
Non lésé	8.54	8.71	14.69	14.76
72 heures	7.83	7.89	13.22	13.62
1 semaine	7.63	7.34	12.90	13.86
2 semaines	7.08	6.82	12.43	12.86
4 semaines	6.53	6.86	11.95	13.73
6 semaines	7.13	6.73	11.82	12.56
3 mois	6.30	6.04	11.67	13.08

Tableau 25 : Valeurs d'ADC// dans la substance grise et blanche caudale des souris Aldh1 et CX3CR1 de 72 heures à 3 mois après une lésion médullaire.

L'observation générale que l'on peut faire à partir des valeurs des Tableaux 25 et 26 est une augmentation au cours du temps des ADC// rostral à la lésion dans les substances grise et blanche, ce qui correspond à une amélioration de l'organisation tissulaire, ou du moins à une intégrité axonale améliorée. Au contraire, dans les parties caudales à la lésion, les ADC// diminuent avec le temps, pour atteindre des valeurs jusqu'à 30% plus faibles qu'avant la lésion dans la substance grise (Fig. 132D). Même si nous ne pouvons pas affirmer cela avec certitude seulement avec un coefficient de diffusion apparent parallèle aux axones, il est probable que la diminution de l'ADC// dans la partie sous lésionnelle caudale de la moelle épinière provienne d'une démyélinisation, qui persiste et s'intensifie jusqu'à 3 mois après la lésion.

3.6.4 Quantification de la lésion en histologie

Nous avons précédemment analysé le volume lésionnel et l'extension lésionnelle de 24 heures à 6 semaines après la chirurgie grâce à des marquages au bleu de toluidine. Nous avons choisi de compléter notre analyse histologique avec un groupe de souris à 3 mois pour les confronter aux informations obtenues en IRM. A la suite de l'IRM *ex vivo* à 3 mois, nous avons donc coupé les moelles épinières au cryostat et effectué les marquages au bleu de toluidine.

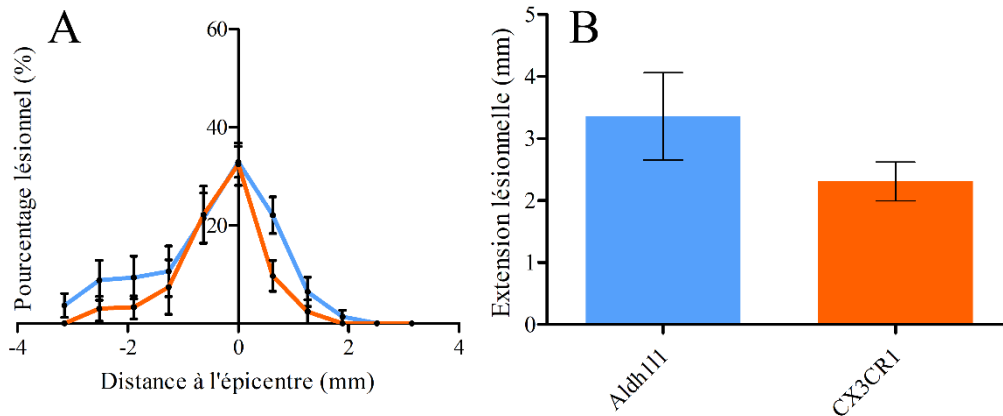


Figure 133 : Quantification du pourcentage lésionnel (A) et de l'extension lésionnelle (B) 3 mois après la chirurgie des souris CX3CR1 (orange) et des souris Aldh111 (bleu) en utilisant la marquage au bleu de toluidine.

Les analyses quantitatives histologiques de l'extension de la lésion et du pourcentage n'ont révélé aucune différence significative entre les souris CX3CR1 et Aldh111 3 mois après la lésion.

3.6.5 Comparaison des observations faites en IRM *ex vivo* pondérée en diffusion et en histologie

Nous avons ensuite comparé le pourcentage lésionnel obtenu en utilisant les 2 modalités d'analyses *ex vivo* à 3 mois, l'IRM pondérée en diffusion et le marquage au bleu de toluidine.

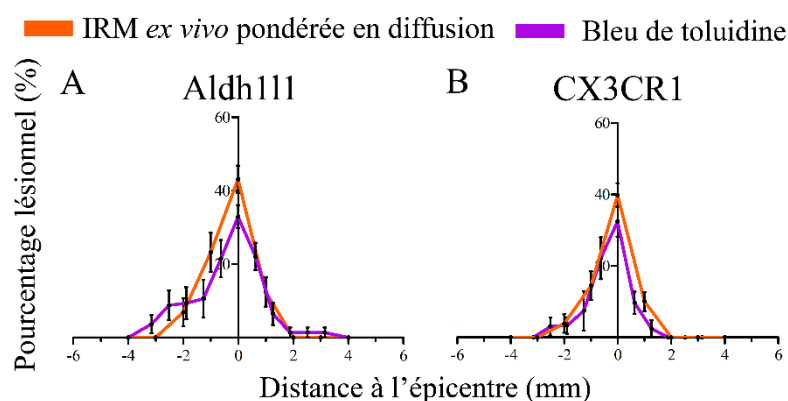


Figure 134 : Comparaison de la zone lésée des mêmes moelles épinières avec l'IRM *ex vivo* pondérée en diffusion (orange) et le bleu de toluidine (violet) pour les souris Aldh111 (A) et CX3CR1 (B).

À l'épicentre, la comparaison du pourcentage de lésion n'a montré aucune différence entre les 2 méthodes d'analyses chez les souris Aldh111 (Fig. 134A) et CX3CR1 (Fig. 134B). Aucune différence n'a été observée dans l'extension de la lésion sur l'axe rostro-caudal, et dans le volume de la lésion. Comme précédemment, nous avons décidé de procéder à des tests de corrélation de Spearman entre les modalités.

Corrélation r_s	Aldh111	CX3CR1
Ex vivo diffusion / Bleu de toluidine	0.930	0.940

Tableau 26 : Analyse de corrélation non-paramétrique: coefficients de corrélation de Spearman (r_s) entre les deux modalités (IRM *ex vivo* pondérée en diffusion et bleu de toluidine).

L'analyse de corrélation non-paramétrique utilisant le coefficient de corrélation de Spearman (r_s) a montré une forte corrélation entre l'IRM *ex vivo* pondérée en diffusion et le marquage histologique au bleu de toluidine (r_s 0.930 pour Aldh111 et 0.940 pour CX3CR1, Tab. 145).

L'utilisation de l'IRM *in vivo* dans l'étude des neurotraumatismes consiste à identifier les modifications tissulaires post-traumatiques aiguës et chroniques et à les corréler avec les changements biochimiques et morphologiques. L'IRM de diffusion *ex vivo* est en général utilisée pour obtenir des valeurs quantitatives (coefficient de diffusion apparent, tenseur) reflétant l'intégrité et la structure globale des tissus. L'IRM *ex vivo* pondérée en diffusion a permis la caractérisation de la structure de la moelle épinière dans un contexte sain (Inglis et al. 1997, 2001), dans des modèles de traumatismes médullaire (Ford et al. 1994; Nevo et al. 2001), un modèle de gliome (Inglis et al. 1999), un contexte de tissus où la myéline est altérée (Gulani et al. 2001), et dans cadre de lésion excitotoxique (Schwartz et al. 1999). Pour notre étude, nous avons mis en place les paramètres d'acquisitions en tenant compte de la nécessité réaliser les

acquisitions dans un temps d'acquisition raisonnable. Cette contrainte est liée au nombre d'échantillons à analyser et à la difficulté d'utiliser des séquences plus rapides que les échos de spins. Nous n'avons caractérisé que le coefficient de diffusion apparent parallèle aux axones, en appliquant le gradient de diffusion dans la direction du gradient de sélection. L'ADC// dans la région rostrale à la lésion mesuré 3 mois après le traumatisme de la moelle épinière a permis de démontrer le retour à valeur obtenue dans un contexte sain (avant la chirurgie) uniquement chez les souris CX3CR1. Au contraire, l'ADC// des souris Aldh111 n'est jamais revenu à la normale. Une étude récente a montré qu'il existe effectivement une différence entre les ADC dans la phase aiguë (moins d'une semaine) par rapport aux ADC dans la phase chronique (plus de 28 jours), montrant une valeur équivalente au contexte sain pour les diffusivités axiales mesurées en phase chronique (Wang-Leandro et al. 2017). Nos résultats reflètent probablement une intégrité axonale supérieure chez les souris CX3CR1 3 mois après la lésion, ce qui coïncide avec leur récupération fonctionnelle supérieure par rapport aux souris Aldh111. Une étude chez l'Homme a montré que l'ADC// dans le cerveau évolue avec l'âge et selon le sexe, avec notamment une diminution de la diffusivité axiale avec l'âge (Kumar et al. 2013). Toutes nos souris sont des femelles, il n'y a donc pas de variabilité dans les mesures dues au genre. Nous avons effectué un suivi sur 3 mois, au premier temps d'analyse (72 heures) les souris ont 3 mois, au dernier, elles en ont 6. Même si les souris sont considérées comme adultes à 3 mois, nous ne pouvons exclure que 3 mois de différence n'a pas d'influence sur les valeurs d'ADC. Néanmoins, en amont de la lésion, les ADC// des deux souches ne diminuent pas, voir augmente au cours du temps. Cette hausse représente donc un retour vers une intégrité axonale normale, et non pas une évolution naturelle due à l'âge. En aval de la lésion, la diminution des ADC// reflète très probablement une démyélinisation des axones résultant de processus de dégénérescence Wallérienne (David and Aguayo 1981). Il est admis, que ce sont principalement les axones de gros diamètre qui sont altérés dans la phase chronique de la lésion médullaire (Blight and Decrescito 1986), et que la plupart des axones épargnés par la lésion sont de petite taille (Schwartz et al. 2005). La majorité des axones étant de petite taille, une diminution de la diffusivité axiale par rapport à un contexte sain est observée (Ellingson et al. 2008), ce qui correspond à nos résultats, avec un ADC// non seulement plus faible en caudal à la lésion et qui diminue au cours du temps. La diffusivité radiale, que nous n'avons pas mesuré, aurait certainement pu fournir des informations importantes sur la structure du tissu, notamment sur l'intégrité de la myéline. C'est une contrainte de temps qui ne nous a pas permis de faire les mesures de diffusion dans d'autres directions. La détection de la diminution de la lésion au cours du temps avec l'IRM pondérée en diffusion uniquement chez les souris CX3CR1, prouve

néanmoins que la technique, même lorsqu'elle est utilisée dans un but d'identification anatomique et couplée avec la mesure de diffusivité axiale est plus sensible que l'IRM pondérée en T2. Des résultats similaires ont été présentés dans une étude visant à évaluer la sensibilité de détection d'une lésion médullaire induite par radiation. L'ADC longitudinal a en effet été décrit comme un outil de détection plus sensible que les images pondérées en T2 pour détecter la lésion dans la substance blanche (Philippens et al. 2009).

Conclusion : l'IRM *ex vivo* en pondération T2 a démontré l'absence de différence dans l'évolution de la lésion entre les souris CX3CR1 et Aldh1l1, que ce soit en utilisant une antenne commerciale ou notre antenne dédiée. Au contraire, l'IRM *ex vivo* pondérée en diffusion souligne une diminution de la zone lésionnelle à l'épicentre uniquement chez les souris CX3CR1, ce qui pourrait refléter une réorganisation des tissus différente après une lésion. De plus, les coefficients de diffusion apparents parallèles des souris CX3CR1 à 3 mois dans les parties rostrales à la lésion retournent aux valeurs avant lésion, ce qui pourrait être un marqueur d'intégrité axonale. Au contraire, en caudal à la lésion, les ADC// semblent indiquer une désorganisation tissulaire persistante pour les deux souches de souris. Finalement, 3 mois après la chirurgie, il n'y a pas de différence significative entre l'IRM *ex vivo* pondérée en diffusion et le marquage au bleu de toluidine, utilisés pour évaluer les tissus endommagés. L'utilisation de l'IRM *ex vivo* pondérée en diffusion est donc validée, permettant d'envisager préférentiellement cette technique post-mortem, moins laborieuse que les techniques d'histologie classique.

3.7 Suivi longitudinal en IRM *in vivo* pondérée en diffusion : comparaison des données obtenues pour les souris CX3CR1 et Aldh111

L'étude en IRM *ex vivo* pondérée diffusion ayant permis la détection d'une différence au niveau de l'évolution de la lésion entre les deux souches, nous avons décidé de mettre en place un suivi longitudinal *in vivo* en IRM pondérée en diffusion. Le principal avantage du suivi longitudinal *in vivo* est de pouvoir suivre les mêmes souris au cours du temps de manière non-invasive. Ainsi, nous avons imagé 7 souris Aldh111 et 7 souris CX3CR1 de 72 heures à 6 semaines après la chirurgie. L'objectif de ce suivi est de confronter les informations obtenues avec l'IRM *ex vivo* pondérée en diffusion et l'IRM pondérée en T2, afin de préciser si l'IRM *in vivo* pondérée en diffusion est un outil de détection plus précis et plus sensible que l'IRM *in vivo* pondérée en T2. En effet, la pondération en T2 n'a pas permis la détection d'une évolution de la lésion.

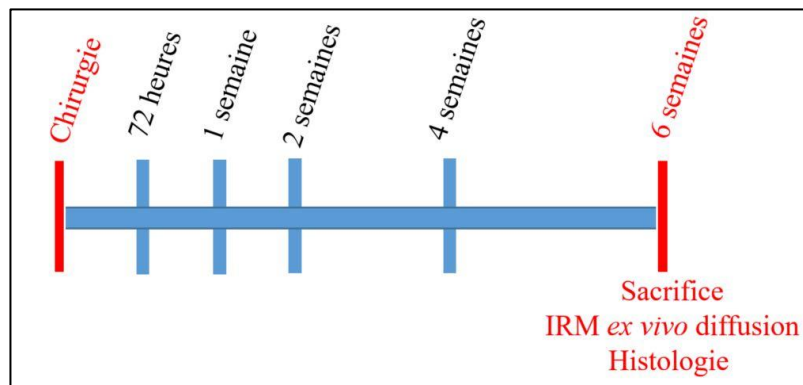


Figure 135: Suivi longitudinal en IRM *in vivo* pondérée en diffusion. Les souris ont été suivies au cours du temps et l'analyse de la lésion a été effectuée à tous les temps d'acquisition.

Une seule séquence pondérée en diffusion a été acquise par souris et par temps d'analyse dans un souci de temps d'anesthésie raisonnable. En effet, les anesthésies étant parfois très rapprochées, nous avons fixé le temps d'anesthésie total à une heure. La séquence pondérée en diffusion (facteur $b = 565\text{s/mm}^2$, gradient de diffusion dans le sens du gradient de sélection) durant en moyenne 37 minutes, il n'a pas été possible de faire l'acquisition de la séquence avec un facteur b nul permettant le calcul du coefficient de diffusion apparent longitudinal (ADC//).

3.7.1 Qualité du signal en IRM *in vivo* pondérée en diffusion

Pour évaluer le signal obtenu avec les paramètres IRM *in vivo*, 65 images provenant des 14 souris scannées de 72 heures à 6 semaines après la chirurgie ont été utilisées pour évaluer le signal, au niveau de l'épicentre. Le gradient de diffusion a été appliqué parallèlement aux axones, ce qui permet de profiter de la différence de propriété des substances blanche et grise,

mais aussi de la zone lésionnelle pour obtenir de bons contrastes. Nous avons choisi de pondérer les images avec un facteur b de 565 s/mm².

Sur 65 images *in vivo* pondérées en diffusion, le SNR moyen (sur les différentes régions d'intérêts) est légèrement meilleur lorsqu'on pondère les images en diffusion (**24.03 ± 0.65**) par rapport aux images pondérées en T2 (**22.05 ± 0.55**). La comparaison statistique du SNR moyen des images pondérées en diffusion et en T2 ne révèle néanmoins pas de différence significative.

<i>Signal sur bruit</i>	Substance grise	Substance blanche	Lésion
SNR	36.21 ± 1.37	24.32 ± 0.93	14.78 ± 0.69

Tableau 27 : Signal sur bruit des différentes régions de la moelle épinière en IRM *ex vivo* pondérée en diffusion.

Dans le cas de l'IRM *in vivo* pondérée en diffusion, le tissu lésionnel apparaît en hyposignal par rapport à la substance grise et à la substance blanche.

Par rapport à la séquence IRM *in vivo* pondérée en T2 :

- le SNR de la substance grise augmente de 48%
- le SNR de la substance blanche augmente de 15%
- le SNR de la zone lésionnelle diminue de 28%

Le T1=1400ms de la lésion est court par rapport au TR effectif d'au moins 10000ms, la séquence n'est donc pas pondérée T1. La perte de signal par rapport à la séquence *in vivo* pondérée T2 est bien due à la sensibilité de la zone de lésion aux gradients de diffusion, et pas à une récupération incomplète du signal.

A nouveau le contraste le plus important est obtenu entre la substance grise et la lésion (CNR=21.43, Tab. 28, Fig. 136). L'amélioration majeure est dans la discrimination de la substance blanche préservée et la lésion. En effet, les images pondérées en diffusion (CNR=10.43, Tab. 28, Fig. 136) permettent d'obtenir un contraste quasiment 5 fois supérieur à celui des images pondérées en T2 (CNR=2.31, Tab. 11, Fig. 102), obtenues dans le premier suivi longitudinal.

<i>Contraste sur bruit</i>	Substance grise / Substance blanche	Substance grise / Lésion	Substance blanche / Lésion
CNR	11.89 ± 0.66	21.43 ± 1.23	10.43 ± 0.69

Tableau 28 : Contraste sur bruit des différentes régions de la moelle épinière en IRM *ex vivo* pondérée en diffusion.

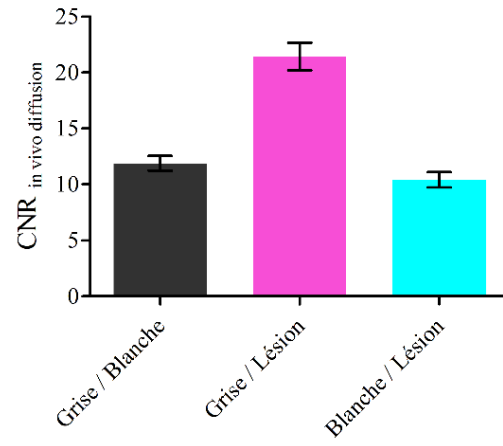


Figure 136 : CNR mesuré sur les IRM in vivo pondérée en diffusion

3.7.2 Quantification de la lésion en IRM *in vivo* pondérée en diffusion

Le suivi longitudinal a permis de suivre les mêmes souris de 72 heures à 6 semaines après la chirurgie. Chaque souris est scannée 5 fois en utilisant le protocole pour obtenir des images pondérées en diffusion (2.5.4). L'analyse de chaque souris pour chaque temps post-lésionnel est faite sur 20 images transversales de 1 mm d'épaisseur, sur un segment de 2 cm centré sur l'épicentre de la lésion.

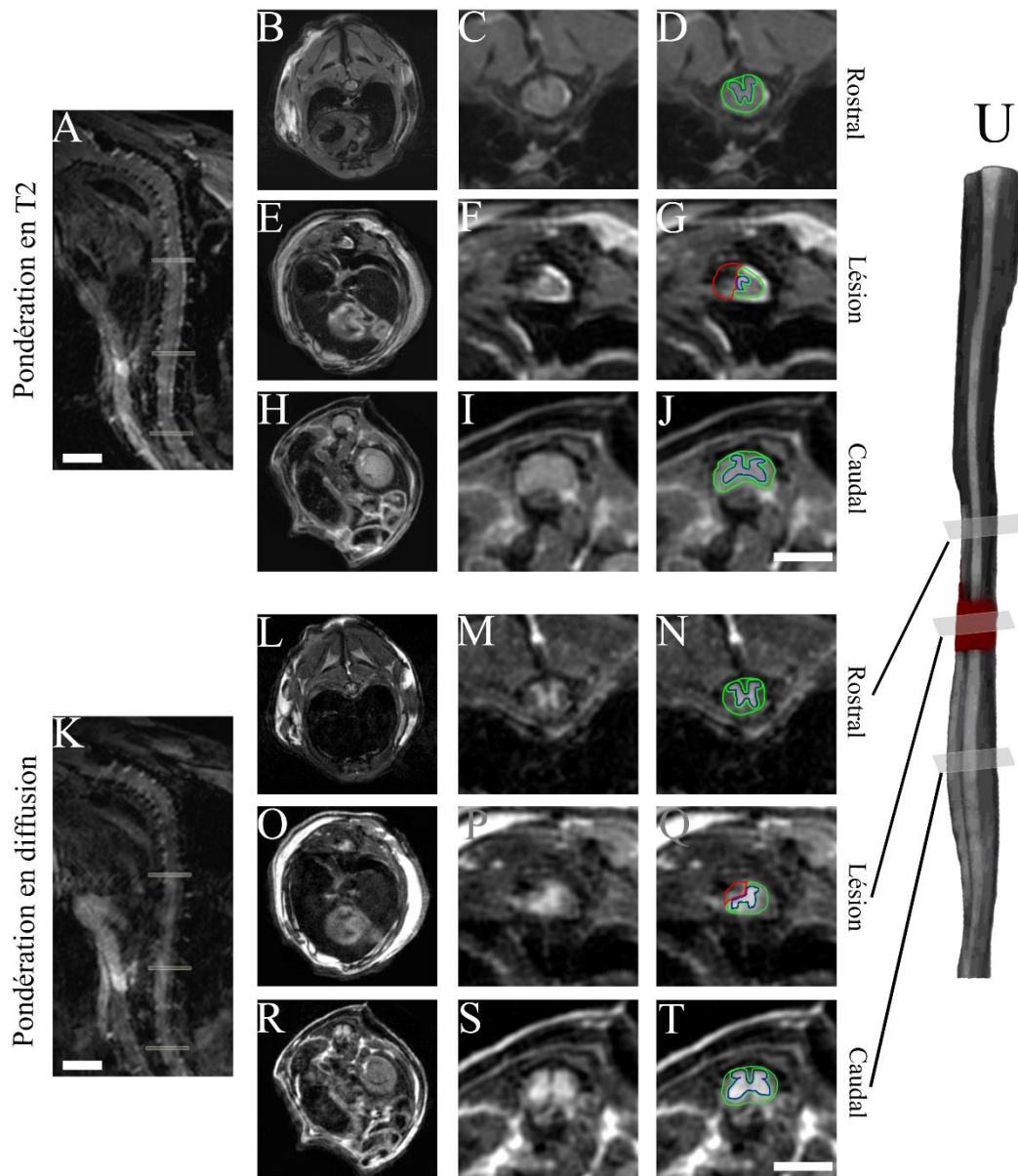


Figure 137 : Acquisition en IRM *in vivo* de la même souris en pondération T2 (A-J) et en diffusion (K-T). Image sagittale *in vivo* en T2 (A) et en diffusion (K). Images axiales *in vivo* prises rostral (B&L), au sein (E&O) et caudal (H&R) à l'épicentre lésionnel. Images zoomées des rectangles blancs indiqués en (A) et (K) (C-I & M-S). Segmentation de la substance grise préservée (bleu), de la substance blanche préservée (vert) et du tissu lésé (rouge) (D-J & N-T). Echelles (A&K) : 3mm, (J&T) : 2.5mm.

Les évaluations quantitatives de la taille des lésions chez les deux souches de souris étaient similaires lors du suivi longitudinal en IRM *in vivo* pondérée en T2. Grace aux résultats encourageants de l'étude *ex vivo* pondérée en diffusion, nous avons décidé d'effectuer un suivi longitudinal IRM *in vivo* pondérée en diffusion. L'imagerie *in vivo* est toujours plus compliquée car en plus du d'un temps d'acquisition limité par l'anesthésie, la qualité des images dépend aussi de la qualité du gating respiratoire et cardiaque. En IRM de diffusion, la puissance des gradients rend l'image plus sensible aux artefacts de mouvement, il faut donc maintenir un rythme respiratoire régulier. Le contraste entre les zones préservées et lésées des images pondérées en diffusion étant bien supérieur, la mesure manuelle de la lésion semble être plus aisée.

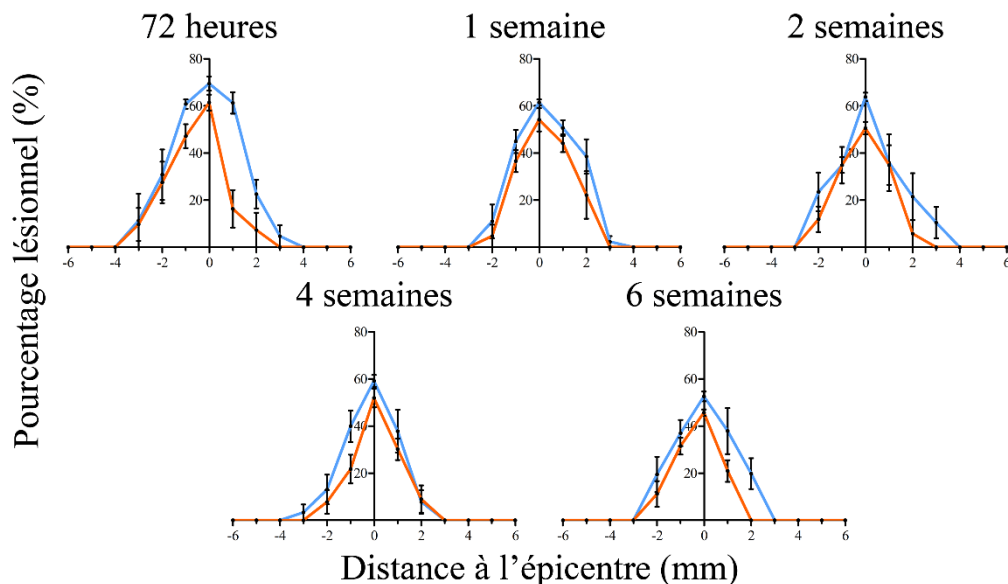


Figure 138 : Quantification longitudinale du pourcentage lésionnel de 72 heures à 6 semaines après la chirurgie des souris CX3CR1 (courbe orange) et des souris Aldh111 (courbe bleue) en utilisant l'IRM *in vivo* pondérée en diffusion.

Dans les résultats présentés dans la Figure 138, la zone lésée diminue au cours du temps chez les 7 souris Aldh111 et les 7 souris CX3CR1. Néanmoins il semble que le volume lésionnel sur l'ensemble de l'axe rostro-caudal soit plus faible chez les souris CX3CR1 du début à la fin du suivi longitudinal. Pour confirmer cette tendance, nous avons effectué diverses évaluations de la lésion chez les deux souches de souris.

L'évaluation en IRM *in vivo* pondérée en diffusion de l'extension de la lésion n'a pas montré de différence au cours du temps entre les deux souches de souris (Fig. 139).

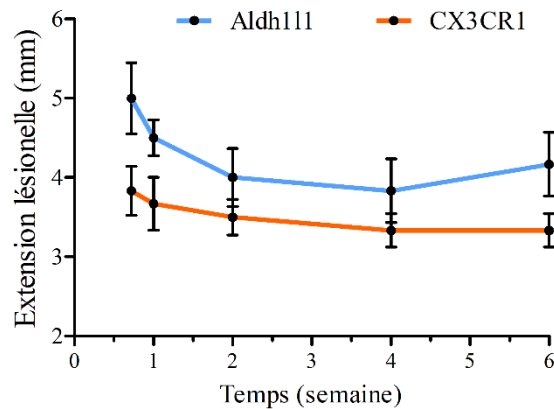


Figure 139 : Evolution de l'extension lésionnelle à l'épicentre au cours du temps chez les souris Aldh111 (bleu) et CX3CR1 (orange).

L'analyse de l'évolution du pourcentage lésionnel à l'épicentre a permis de détecter pour la première fois une diminution de la zone lésée chez les deux souches de souris (Fig. 140). Les souris CX3CR1 présentent une diminution significative du pourcentage de tissu lésé à l'épicentre à partir de 4 semaines après la lésion atteignant $46 \pm 1.6\%$ et $44 \pm 1.1\%$ à 4 et 6 semaines, respectivement, contre $61 \pm 2.3\%$ observés à 72 heures. Les souris Aldh111 présentent également une diminution significative du pourcentage de tissu lésé à l'épicentre, mais plus tardive, puisqu'il faut attendre 6 semaines pour la détecter. 72 heures après la chirurgie, le pourcentage est de $69 \pm 2.5\%$ pour ensuite descendre à $52 \pm 2.1\%$ à 6 semaines. De plus, l'ANOVA 2 voies effectuée permet d'affirmer qu'il y a une différence d'évolution de la lésion à 4 semaines. Entre 2 semaines et 4 semaines, le pourcentage lésionnel baisse de manière plus marquée chez les CX3CR1 que chez les Aldh111 (Fig. 140). La lésion et l'organisation tissulaire évoluent certainement différemment entre les deux souches de souris à partir de 4 semaines, ce qui peut paraître un peu tardif, mais pas en opposition avec l'analyse comportementale qui montre une progression des souris jusqu'à la fin du protocole à 6 semaines. Par ailleurs, nous avons vérifié par un t-test l'absence de différence entre les deux souches à 72 heures.

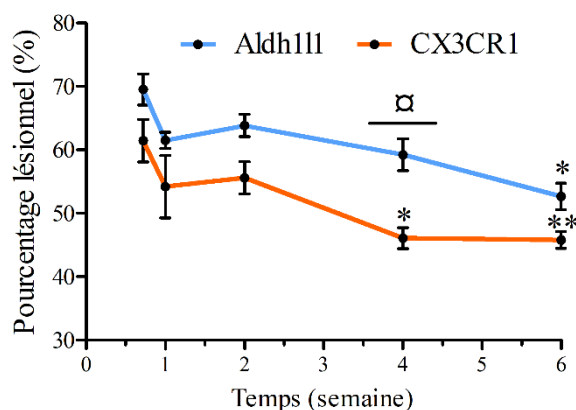


Figure 140 : Evolution du pourcentage lésionnel à l'épicentre au cours du temps chez les souris Aldh111 (bleu) et CX3CR1 (orange). ANOVA 1 voie : * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; ANOVA 2 voies : □ $p < 0.05$.

Les souris CX3CR1 présentent une diminution significative du volume moyen de la lésion entre 72 heures et 6 semaines après la lésion. En effet, 72 heures après la chirurgie, le volume moyen de lésion, quantifié grâce à l'aire sous la courbe, était de 170 ± 16 pour ensuite descendre à 109 ± 8 à 6 semaines (Fig. 140). Contrairement à l'épicentre lésionnel, le volume total lésionnel n'a pas montré d'évolution significative chez les souris Aldh111. La réorganisation tissulaire ne serait donc pas uniforme sur l'axe rostro-caudal puisque à l'épicentre une évolution est observée à partir de 4 semaines, et que ce n'est qu'à 6 semaines post lésion qu'une diminution du volume lésionnel (représentant la totalité de la lésion) est observée. Néanmoins, l'étude effectuée en IRM *ex vivo* pondérée en diffusion a montré une diminution du volume lésionnel dès 4 semaines chez les souris CX3CR1 (Fig. 127 et 128). L'absence de significativité à 4 semaines provient peut-être d'une plus grande difficulté à identifier la lésion en *in vivo*.

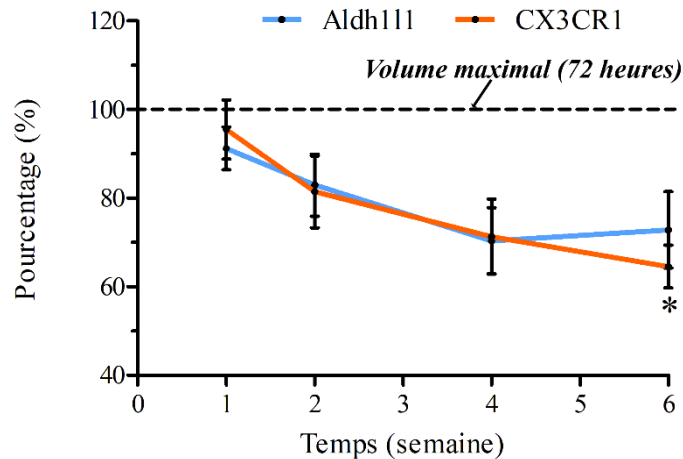


Figure 141 : Evolution du volume lésionnel sur l'axe rostro-caudal au cours du temps chez les souris Aldh111 (bleu) et CX3CR1 (orange). ANOVA 1 voie : * $p < 0.05$.

Le pourcentage à l'épicentre est essentiel même s'il ne permet pas de conclure sur l'ensemble de l'axe rostro-caudal. Quand il dépasse environ 70% quelques semaines après la chirurgie, les souris sont exclues des groupes. En effet, la patte lésée ne récupère pas sa mobilité et les symptômes s'apparentent plus à une paraplégie complète qu'à une monoplégie. Nous quantifions donc aussi le volume lésionnel total, sous forme d'aire sous la courbe. Dans les résultats précédents, nous avons démontré une diminution de la lésion chez les CX3CR1, tant à l'épicentre que sur l'axe rostro-caudal. Comme nous l'avons vu, le pourcentage de tissus préservé à l'épicentre sera, du moins partiellement, reflété par la récupération (ou la vitesse de récupération) de l'animal. En utilisant l'IRM pondérée en T2, nous avons identifié chez les mêmes souris une évolution de la lésion à l'épicentre passant d'environ 65% à 72 heures à 50% à 6 semaines.

Bien que le premier rapport d'IRM *in vivo* sur un modèle de lésion médullaire chez le rat ait été publié il y a plus de trois décennies (Hackney et al. 1986), ce n'est qu'au cours des 10 dernières années que les techniques d'IRM ont été appliquées plus régulièrement aux modèles de rongeurs. La plupart des études ont préféré l'utilisation du rat plutôt que la souris, probablement en raison de la limitation de la force du champ magnétique. L'acquisition IRM *in vivo* chez les souris est particulièrement difficile en raison du diamètre restreint de leur moelle épinière par rapport aux rats. La majorité des études IRM se sont concentrées sur la souche de souris C57BL/6 (Bilgen et al. 2007; Bonny et al. 2004; Kim et al. 2010). Dans notre étude, nous avons rencontré lors de notre suivi longitudinal en IRM *in vivo* beaucoup moins d'artefact de signal chez les CX3CR1, qui ont un fond génétique C57Bl/6, par rapport aux souris Aldh111, qui ont

un fond génétique Swiss Webster. Les séquences IRM utilisées étant les mêmes pour les deux souches de souris, la différence de qualité des images provient probablement de la masse grasse. En effet, les souris Aldh1l1 ont une proportion de graisse plus importante, ceci étant par ailleurs reflété par un poids d'environ 30g à la fin de l'expérience, contre 25g pour les souris CX3CR1. Il est reconnu que le signal de graisse résiduelle dans la périphérie peut parfois se superposer sur les parties centrales de l'image, masquant éventuellement des lésions à l'intérieur du corps (Takahara et al. 2004).

Lors du premier suivi longitudinal IRM *in vivo* pondéré en T2, nous avons choisi de commencer notre étude 24 heures après la chirurgie, afin d'avoir une image de la lésion le plus tôt possible. Nous avons rencontré plusieurs difficultés à 24 heures post-lésion, notamment un œdème vasogénique important, qui a faussé la mesure du pourcentage lésionnel chez 2 animaux. Il existe d'ailleurs des preuves d'accumulation d'eau dans le parenchyme de la moelle épinière dès 2 h après la lésion (Rowland et al. 2008; Saadoun and Papadopoulos 2010). L'une des seules études chez l'Homme comparant l'imagerie pondérée T2 et diffusion montre qu'il n'y a pas de différence entre les deux protocoles à 24 heures post-lésion (Pouw et al. 2012). Dans cette étude, c'est l'œdème qui est limitant pour identifier des différences quantitatives entre les images pondérées T2 et diffusion. De plus, comme l'anesthésie nécessaire à l'acquisition IRM seulement 24 heures après la chirurgie rend les animaux fragiles et engendre des stress évitables, nous avons choisi de commencer le suivi en IRM 72 heures après la chirurgie. Ceci permet à la fois de laisser les animaux au repos complet pendant 3 jours et d'éviter un œdème maximal (jusqu'à 48 heures), tout en ayant un temps d'analyse relativement proche de la chirurgie.

Des études ont souligné l'impact des artefacts liés au mouvement sur des images de la moelle épinière de rongeur pondérées en diffusion en *in vivo* (Benveniste et al. 1998). Les images acquises au niveau cervical de la moelle épinière ne présentent en général pas de mouvement, et l'anatomie est clairement visible. En revanche, malgré le déclenchement des acquisitions synchronisé avec les rythmes cardiaque et respiratoire, des artefacts de mouvement sont souvent présent sur les images pondérées en diffusion au niveau thoracique et lombaire. Cela est particulièrement vrai pour de plus grandes valeurs de facteur b. Nous avons choisi de faire l'hémisection latérale de la moelle épinière au niveau thoracique 9, par conséquent, les images ont parfois été artéfactées, mais nous avons toujours obtenu une image d'une qualité suffisante au niveau T9 pour tous les animaux à tous les temps d'intérêt. Le choix de la lésion en T9 a été pris afin de rester dans les mêmes conditions que les études réalisées au laboratoire. Nous avons

en effet un ensemble de données comportementales, transcriptomiques et histologiques à ce niveau lésionnel et les déficits des membres postérieurs engendrés par une lésion au niveau thoracique sont très bien caractérisés (Gaviria et al. 2002).

Notre objectif était d'utiliser des images pondérées en diffusion pour identifier *in vivo* le volume d'une lésion après une hémisection latérale de la moelle épinière au niveau T9 chez la souris. Comme indiqué précédemment, les images pondérées en diffusion sont adaptées en raison de leur sensibilité qui permet d'identifier des anomalies comme une ischémie (Gaviria et al. 2006; Fragata et al. 2018) ou une démyélinisation (Gulani et al. 2001). Cet objectif est difficile en raison du rétrécissement du diamètre de la moelle épinière au niveau thoracique (1mm de diamètre environ) et de la sensibilité de la région thoracique aux artefacts de mouvement. Nous avons cependant réussi à quantifier le volume et l'extension de la lésion de 72 heures à 3 mois après la chirurgie grâce à des images pondérées en diffusion. Dans les études sur les lésions médullaires, l'IRM de diffusion est très généralement utilisée pour étudier la structure des tissus, et est combinée avec de l'IRM pondérée T1 ou T2 pour effectuer l'analyse anatomique. L'IRM de diffusion fournit des valeurs quantitatives (coefficient de diffusion apparent, tenseur) reflétant l'intégrité et la structure globale des tissus. Nous avons choisi d'utiliser l'IRM de diffusion seulement pour effectuer l'analyse anatomique car cela permet d'obtenir un contraste bien supérieur qu'en IRM pondération T2. A cause de la durée d'anesthésie, il n'a pas été possible de faire les acquisitions nécessaires à l'obtention des valeurs quantitatives de diffusion en utilisant nos séquences échos de spin. La détection de la diminution de la lésion au cours du temps avec l'IRM pondérée en diffusion prouve néanmoins que la technique, même lorsqu'elle est utilisée uniquement dans un but d'identification anatomique, est plus sensible que l'IRM pondérée en T2. Cette analyse a d'ailleurs permis d'identifier une diminution du pourcentage lésionnel à l'épicentre chez les deux souches de souris, ce qui n'a pas été le cas dans l'étude IRM *ex vivo* pondérée en diffusion. En effet, dans l'étude *ex vivo*, la diminution du pourcentage lésionnel à l'épicentre a été détecté seulement chez les souris CX3CR1. Cette différence entre les protocoles *in vivo* et *ex vivo* provient très certainement de la variabilité du nombre d'animaux dans le suivi *ex vivo*, alors que ce sont les **mêmes** 7 souris qui ont été suivies en IRM *in vivo*. Ces résultats montrent donc qu'un suivi longitudinal sur les mêmes animaux est toujours préférable à une analyse de plusieurs groupes séparés, même si les conditions sont très proches.

L'utilisation d'un modèle animal plus proche de l'Homme, comme le *Microcebus murinus* pourrait amener des informations supplémentaires, ceci étant d'autant plus vrai que la

transposition des résultats obtenus sur les animaux est facilitée par le développement de l'IRM de diffusion *in vivo* chez l'homme depuis une quinzaine d'années (Clark and Werring 2002). L'implémentation de séquences plus rapides sur notre appareil IRM permettant l'acquisition de valeurs quantitatives de diffusion paraît indispensable dans le futur. Une combinaison d'IRM de diffusion et d'IRM fonctionnelle pourrait aussi permettre des corrélations plus précises entre récupération fonctionnelle et signaux IRM.

Conclusion : Le suivi longitudinal en IRM *in vivo* en pondération diffusion a démontré une diminution de la zone lésionnelle à l'épicentre chez les souris CX3CR1 à partir de 4 semaines, et seulement à partir de 6 semaines chez les souris Aldh1l1. Ceci est compatible avec les résultats de l'analyse comportementale, qui démontrent une récupération plus tardive des souris Aldh1l1. Cependant, lorsque l'analyse est effectuée sur l'axe rostro-caudal, une diminution du volume lésionnel est observée uniquement chez les souris CX3CR1 6 semaines après le traumatisme.

3.7.3 Quantification de la lésion en IRM *ex vivo* pondérée en diffusion

A la suite de l'IRM *in vivo* pondérée diffusion, les animaux sont sacrifiés, les moelles prélevées, et une IRM *ex vivo* pondérée diffusion est effectuée. L'analyse est faite sur 36 images transversales de 1 mm d'épaisseur, sur un segment de 3.6 cm centré sur l'épicentre de la lésion. La segmentation est effectuée manuellement en segmentant les parties préservées et les parties lésées sur toutes les images transversales (Fig. 142).

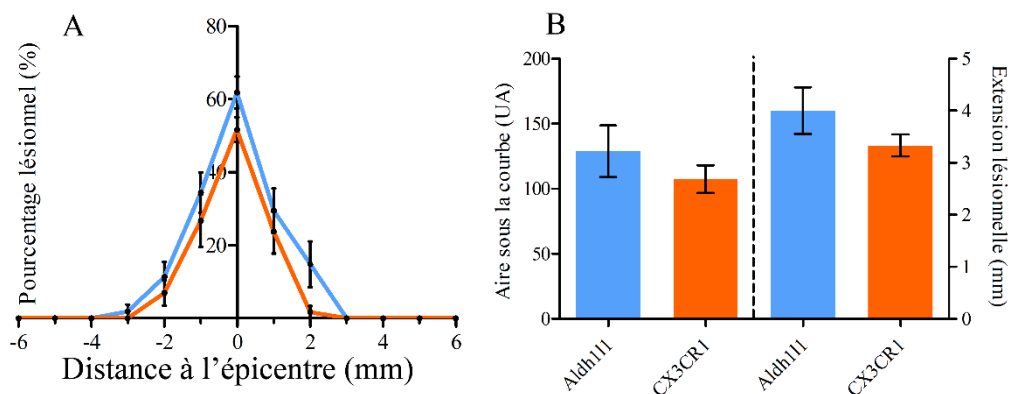


Figure 142 : Quantification du pourcentage lésionnel (A), du volume lésionnel et de l'extension lésionnelle (B) 6 semaines après la chirurgie des souris CX3CR1 (orange) et des souris Aldh1l1 (bleu) en utilisant le marquage au bleu de toluidine.

Les analyses quantitatives en IRM *ex vivo* pondérée en diffusion de l'extension de la lésion, du volume et du pourcentage lésionnel n'ont révélé aucune différence significative entre les souris CX3CR1 et Aldh111 6 semaines après la lésion (Fig. 142)

3.7.4 Quantification de la lésion en histologie

Les moelles épinières des 14 souris suivies longitudinalement en *in vivo* puis en ex IRM *ex vivo* sont préparées pour l'histologie en faisant des coupes au cryostat de 14 μ m d'épaisseur.

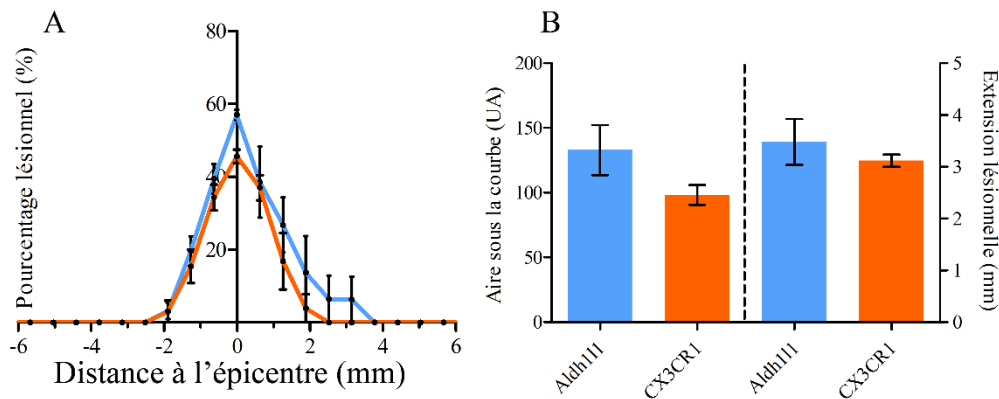


Figure 143 : Quantification du pourcentage lésionnel (A), du volume lésionnel et de l'extension lésionnelle (B) 6 semaines après la chirurgie des souris CX3CR1 (orange) et des souris Aldh111 (bleu) en utilisant le marquage au bleu de toluidine.

Les analyses quantitatives en histologie de l'extension de la lésion, du volume et du pourcentage lésionnel n'ont révélé aucune différence significative entre les souris CX3CR1 et Aldh111 6 semaines après la lésion (Fig. 143).

3.7.5 Comparaison des observations faites dans le suivi longitudinal IRM *in vivo* pondérée en diffusion, en IRM *ex vivo* pondérée en diffusion et en histologie

Nous avons ensuite comparé le pourcentage lésionnel obtenu en utilisant les 3 modalités d'analyses à 6 semaines, le suivi longitudinal des 14 souris (n=7 pour chaque souche) en IRM *in vivo* pondérée en diffusion, l'IRM *ex vivo* pondérée en diffusion et le marquage au bleu de toluidine.

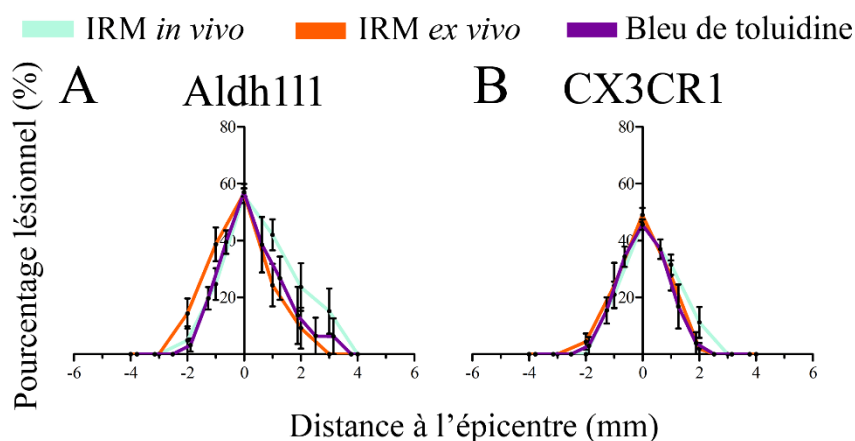


Figure 144 : Comparaison de la zone lésée des mêmes moelles épinières avec l'IRM *in vivo* pondérée en diffusion (bleu clair), l'IRM *ex vivo* pondérée en diffusion (orange) et le bleu de toluidine (violet) pour les souris *Aldh111* (A) et *CX3CR1* (B).

À l'épicentre, la comparaison du pourcentage de lésion n'a montré aucune différence entre les 3 méthodes d'analyses chez les souris *Aldh111* (Fig. 144A) et *CX3CR1* (Fig. 144B). Aucune différence n'a été observée dans l'extension de la lésion sur l'axe rostro-caudal, et dans le volume de la lésion. Comme précédemment, nous avons procédé à des tests de corrélation de Spearman entre les modalités.

Corrélation r_s	Aldh111	CX3CR1
<i>In vivo</i> diffusion / <i>Ex vivo</i> diffusion	0.959	0.942
<i>In vivo</i> diffusion / Bleu de toluidine	0.914	0.937
<i>Ex vivo</i> diffusion / Bleu de toluidine	0.962	0.991

Tableau 29 : Analyse de corrélation non-paramétrique: coefficients de corrélation de Spearman (r_s) entre les trois modalités (IRM *in vivo* pondérée en diffusion, IRM *ex vivo* pondérée en diffusion et bleu de toluidine).

L'analyse de corrélation non-paramétrique utilisant le coefficient de corrélation de Spearman (r_s) a montré une forte corrélation entre l'IRM *ex vivo* pondérée en diffusion et le marquage histologique au bleu de toluidine (r_s 0.962 pour *Aldh111* et 0.991 pour *CX3CR1*, Tab. 30).

Conclusion : ces résultats montrent qu'à 6 semaines après la chirurgie, il n'y a pas de différence significative entre les trois modalités utilisées pour évaluer les tissus endommagés. L'utilisation de l'IRM *in vivo* pondérée en diffusion est donc validée, puisqu'elle est confirmée par deux techniques *ex vivo* dont la résolution permet sans équivoque la visualisation de la lésion.

3.8 Réactivité gliale entre les souris CX3CR1 et Aldh111

L'étude immunohistochimique de la moelle épinière des souris lésées médullaires permet d'observer l'organisation et la réactivité des cellules gliales au niveau de la lésion aux différents temps d'analyse. Cette étude est réalisée sur des coupes de moelle épinière des souris du groupe du premier suivi longitudinal sacrifiées à la 6^{ème} semaine post-chirurgie. Nous avons complété notre analyse en utilisant sur des groupes additionnels de souris par une comparaison la réactivité de la microglie et des astrocytes entre les deux souches de souris à 24 et 72 heures, 1, 2 et 4 semaines et 3 mois après la lésion (Fig. 145).

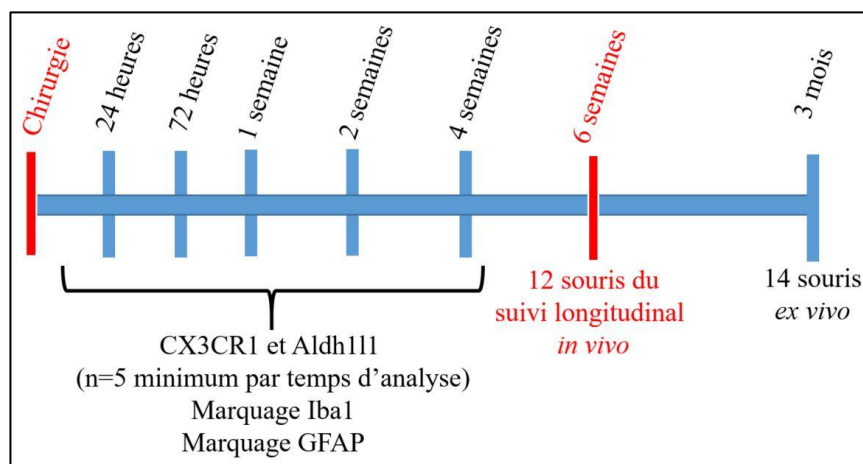


Figure 145 : Comparaison de la réactivité gliale entre les souris Aldh111 et CX3CR1 de 24 heures à 3 mois après la lésion.

3.8.1 Microglie et astrocytes

Après avoir coupé les moelles épinières au cryostat (14µm d'épaisseur), une analyse qualitative et quantitative de la réactivité gliale est effectuée en utilisant les marquages IBA1 (marqueur microglie/macrophage) et GFAP (marqueur astrocyte) chez les souris CX3CR1 et Aldh111.

a) Microglie

L'augmentation de l'expression d'IBA1 est marquée en contralatéral à l'épicentre de la lésion dans les matières grises et blanches de la moelle épinière (Fig. 146E & F) dans les deux souches de souris. Les microglies, ou macrophages, amiboïdes (activées) avec des corps cellulaires élargis et des processus courts et épais ont été principalement trouvés au site lésionnel (Fig. 146 G & H). Des microglies ramifiées avec de petits corps cellulaires et des prolongements fins ont été observées en position distale par rapport au site de la lésion (Fig. 146A & B et C & D).

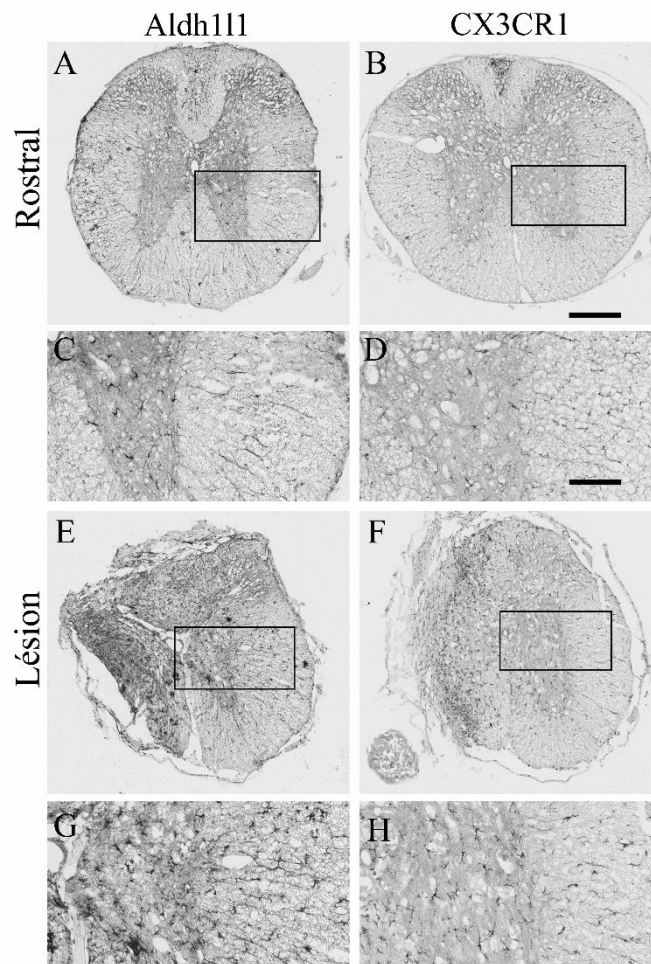


Figure 146 : Photographies sur fond clair montrant des microglies/macrophages IBA1-positifs après une lésion chez les souris Aldh111 (A, C, E et G) et CX3CR1 (B, D, F et H) rostrales (A-D) et dans la lésion (E-H).

Echelle : (B) : 300µm ; (D) : 100 µm.

L'analyse quantitative entre les deux souches de souris à 6 semaines après la lésion a révélé une expression d'IBA1 inférieure dans les substances grises et blanches des CX3CR1 par rapport aux souris Aldh111 (ANOVA à 2 voies, Figure 147A & B).

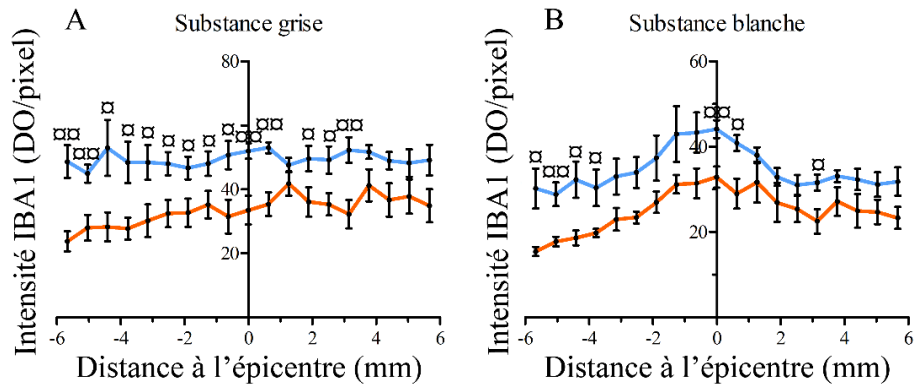


Figure 147 : Quantification de l'immunoréactivité IBA1 le long du segment rostro-caudal dans la substance grise (A) et la blanche (B) chez les souris Aldh111 (bleu) et CX3CR1 (orange) à 6 semaines post-lésion. ANOVA 2 voies : □ $p < 0.05$, ◻ $p < 0.01$

Pour évaluer de potentielles variations au cours du temps de la réactivité microgliale entre les deux souches de souris, nous avons également examiné l'expression d'IBA1 à 24 et 72 heures, 1, 2 et 4 semaines après la lésion. Ces analyses ont également révélé une réactivité des microglies inférieure à 24 heures post-lésion dans la substance blanche de la moelle épinière des souris CX3CR1 par rapport aux souris Aldh111 (ANOVA à 2 voies).

Pour évaluer si l'expression d'IBA1 réduite observée chez CX3CR1 à 24 et 6 semaines après la lésion persiste à un stade plus chronique, nous avons quantifié son expression 3 mois après la lésion. Comme 6 semaines après la lésion, des microglies ramifiées ont été observées rostral au site de la lésion dans les deux souches. Une diminution de l'activation microgliale à 3 mois par rapport à 6 semaines après la lésion est observée chez les souris Aldh111 et CX3CR1. De plus, l'expression d'IBA1 chez CX3CR1 est inférieure dans la substance grise 2 mm rostral à la lésion par rapport aux souris Aldh111.

b) Astrocytes

Les astrocytes proches du site de la lésion semblent proches les uns des autres et présentent une morphologie allongée avec de nombreux prolongements qui se superposent (Fig. 148G&H). Le marquage de la GFAP à 3 mois après la lésion a révélé une expression accrue à l'épicentre de la lésion (Figure 1548E-H) par rapport aux régions rostrales (Figure 148A-D) et caudales dans les deux souches de souris.

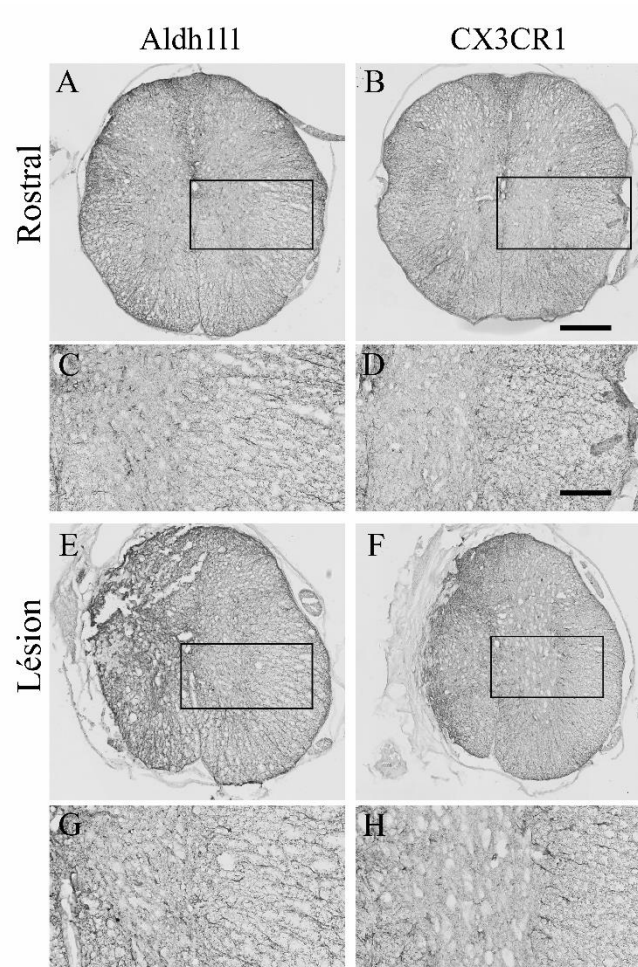


Figure 148 : Photographies sur fond clair montrant des astrocyte GFAP-positifs après une lésion chez les souris *Aldh111* (A, C, E et G) et *CX3CR1* (B, D, F et H) en localisation rostrale (A-D) et dans la lésion (E-H). Echelle : (B) : 300 μ m ; (D) : 100 μ m.

L'analyse quantitative entre les deux souches de souris à 6 semaines après la lésion a révélé une expression de GFAP inférieure dans la substance grise des *CX3CR1* par rapport aux souris *Aldh111* (ANOVA à 2 voies, Figure 149).

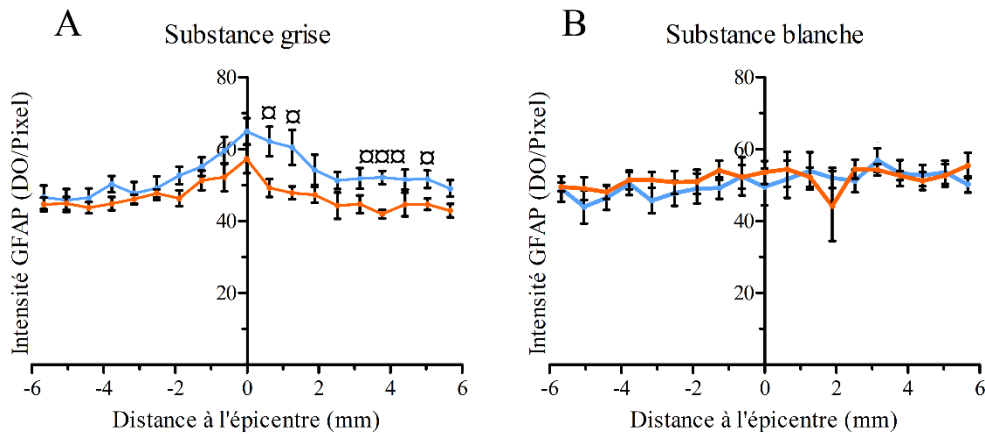


Figure 149 : Quantification de l'immunoréactivité de GFAP le long du segment rostro-caudal dans la substance grise (A) et blanche (B) chez les souris *Aldh111* (bleu) et *CX3CR1* (orange) à 3 mois post-lésion. ANOVA 2 voies : α $p < 0.05$, $\alpha\alpha\alpha$ $p < 0.001$

Nos résultats de comportement démontrant une meilleure récupération fonctionnelle et un comportement anxieux réduit après la lésion médullaire chez les *CX3CR1* coïncide donc avec une gliose inférieure.

Il a très récemment été montré qu'après une contusion de la moelle épinière, les souris knock-out pour la protéine inactive liée à la phospholipase C (PRIP) présentent non seulement un comportement plus anxieux que les souris de type sauvage mais aussi une altération motrice amplifiée et une augmentation de l'expression de la GFAP et d'IBA1 à l'épicentre de la lésion, reflétant une gliose élevée (Fujita et al. 2018). Une association entre une inflammation réduite et une régénération axonale augmentée a été démontrée après une contusion de la moelle épinière (Ma et al. 2004). De plus, des études précédentes ont montré des différences de réponse gliale en fonction des souches de souris. Par exemple, les souris *C57BL/6* développent une inflammation plus importante après un traumatisme médullaire (Kigerl, McGaughy, and Popovich 2006) que les souris *BALB/c* et une expression accrue de la GFAP a été observée chez les souris *129X1-SvJ* par rapport aux souris *C57BL/6* après une contusion de la moelle épinière (Ma et al. 2004; Dixon et al. 2012). Nos résultats montrant une astrogliose réduite chez *CX3CR1* après lésion médullaire, même si elle est limitée par rapport à la réduction de la microgliose, suggère qu'une diminution de la réactivité astrocytaire peut contribuer à favoriser la récupération fonctionnelle chez les souris *CX3CR1* par rapport aux souris *Aldh111*. Ces résultats sont en accord avec une récente étude dont la stratégie est de greffer des cellules souches olfactives dans la moelle épinière lésée. En effet, les rats greffés présentaient une inflammation réduite, avec une immunoréactivité IBA1 et GFAP inférieure aux animaux

contrôle (sham) et une récupération fonctionnelle respiratoire et motrice supérieure (Stamegna et al. 2018).

Comme précédemment décrit, (voir introduction/astrocytes), les astrocytes ont aussi un effet néfaste sur la récupération après une lésion de la moelle épinière. Des souris transgéniques présentant une double inactivation de la GFAP et de la vimentine, ce qui permet de réduire l'astrogliose, montrent une régénération axonale accrue et une récupération fonctionnelle améliorée après une hémisection latérale de la moelle épinière (Menet et al. 2003). De plus, le blocage de la formation de la cicatrice gliale par l'intermédiaire de l'inhibition de l'expression des protéines du cytosquelette des astrocytes favorise la récupération fonctionnelle après une LME chez les souris (Desclaux et al. 2015) et les rats (Do-Thi et al. 2016). Au contraire, d'autres études démontrent un rôle positif des astrocytes réactifs après une LME, comme la formation réduite de microcavités (Faulkner et al. 2004), une réduction de l'inflammation (Wanner et al. 2013) et l'expression de facteurs pro-régénératifs (Anderson et al. 2016). Récemment, nous avons démontré que la réponse astrocytaire après une LME chez les souris *Aldh111* n'est pas seulement déterminée par le temps post-lésionnel et la gravité de la lésion, mais également induit une transdifférenciation des astrocytes en progéniteurs neuronaux (Noristani et al. 2016). En effet, plus de 10% des astrocytes matures expriment des marqueurs progéniteurs neuronaux classiques, y compris la β III-tubuline et la doublecortine, et montrent une morphologie neuronale immature typique. De manière intéressante, nous avons observé que le nombre d'astrocytes exprimant la β III-tubuline est plus abondant chez les souris *CX3CR1* que chez les souris *Aldh111*. Nous pouvons donc supposer que les astrocytes de la moelle épinière peuvent en fait être constitués de plusieurs sous-populations qui réagissent de façon différente après une LME.

Conclusion : Ces données démontrent une gliose réduite chez les souris *CX3CR1* par rapport aux souris *Aldh111* après une lésion de la moelle épinière. Cette réduction étant associée à une meilleure récupération fonctionnelle motrice et une diminution de comportement de type anxiété.

3.8.2 Sérotonine

La neurotransmission sérotoninergique dans la moelle épinière est cruciale à la fonction motrice et l'innervation sérotoninergique joue un rôle direct dans la récupération fonctionnelle après une lésion médullaire. Pour évaluer si la récupération fonctionnelle améliorée chez les souris CX3CR1 est liée à l'innervation sérotoninergique, nous avons effectué un marquage en utilisant un anticorps sérotonine-transporteur (SERT) (Fig. 150). SERT est un marqueur des axones sérotoninergiques, en particulier dans les conditions de neurotransmission sérotoninergique réduite (Nielsen et al. 2006). La visualisation par immunofluorescence de la moelle épinière non lésée en utilisant la sérotonine (5-HT) et les anticorps SERT montre un ensemble d'axones sérotoninergiques identiques dans la substance grise de la moelle épinière (Fig. 150). Le marquage peroxydase a révélé une densité plus élevée des axones SERT dans la substance grise par rapport à la substance blanche de la moelle épinière non lésée (figure 151D). Les axones SERT sont apparus principalement sous la forme de prolongements fins et épais avec de nombreuses varicosités caractéristiques des profils axonaux.

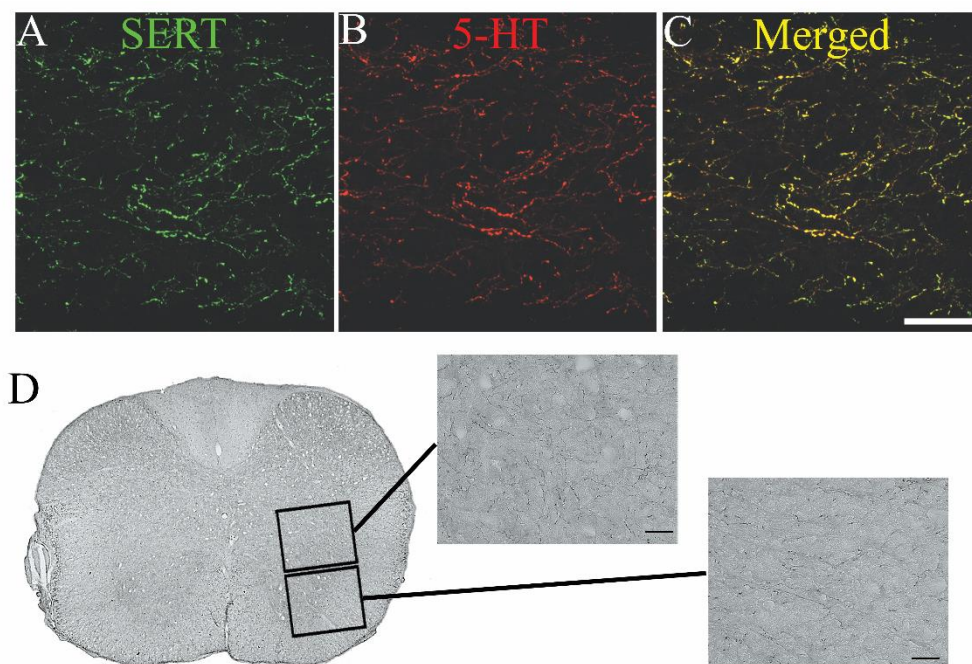


Figure 150 : Photographies en microscopie confocale montrant le transporteur de sérotonine (SERT, vert, A) la sérotonine (5-HT, rouge, B) et la colocalisation (jaune, C) dans une moelle non lésée. Photographies à fond clair montrant des axones SERT positifs dans les matières blanches et grises de la moelle épinière non lésée (D). Echelle (A-C): 50 μ m, (D): 20 μ m.

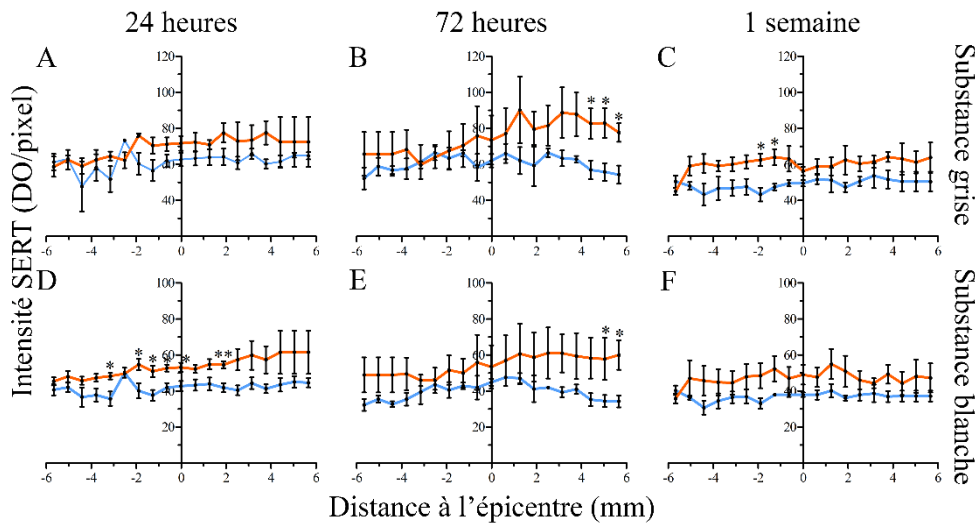


Figure 151 : Quantification de l'expression de SERT le long du segment rostro-caudal chez les souris *Aldh111* (bleu) et *CX3CR1* (orange) dans la substance grise (A-C) et la substance blanche (D-F) de la moelle épinière de 24 heures à 1 semaine. T-test non pairé * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Une meilleure récupération fonctionnelle chez les souris *CX3CR1* par rapport aux souris *Aldh111* coïncide donc avec une augmentation de l'innervation sérotoninergique, augmentation qui est évidente au cours de la semaine suivant la lésion. C'est au cours de la première semaine que qu'une meilleure coordination entre les pattes est observée chez les souris *CX3CR1*. Ces résultats confirment que l'innervation sérotoninergique dans la moelle épinière est un bon prédicteur de la récupération fonctionnelle, confirmant ainsi les résultats positifs obtenus dans des études dont la stratégie thérapeutique visait à améliorer la neurotransmission de 5-HT après une lésion de la moelle épinière (Antri et al. 2003; D'Amico et al. 2013; Gimenez y Ribotta et al. 1998; Hains et al. 2001; Ghosh and Pearse 2014).

Conclusion : ces données montrent une augmentation de l'innervation sérotoninergique chez les souris *CX3CR1* comparativement aux souris *Aldh111* jusqu'à 1 semaine après la lésion de la moelle épinière. Cette augmentation étant associée à une meilleure récupération fonctionnelle motrice.

3.9 Application thérapeutique expérimentale : déplétion transitoire de la prolifération de la microglie chez la souris

Dans la littérature, le rôle des astrocytes dans la cicatrice gliale qui se met en place après une LME est majoritairement étudié, cependant cette cicatrice gliale est aussi composée de microglies. Nous nous sommes donc intéressés et à l'effet qu'une déplétion transitoire de la prolifération des microglies pourrait avoir. Plusieurs études mettent en évidence qu'une inhibition spécifique de CSF1R via le GW2580, améliore les symptômes de certaines maladies neurodégénératives présentant une activation des cellules de la microglie dont les maladies à prions (Gómez-Nicola et al. 2013), la maladie d'Alzheimer (Olmos-Alonso et al. 2016) et la sclérose latérale amyotrophique (Martínez-Muriana et al. 2016). Les microglies ont à la fois un effet positif et négatif dans un contexte de traumatisme médullaire, nous cherchons à évaluer l'effet de la déplétion de la prolifération de ces cellules sur la mise en place de la cicatrice gliale et la récupération fonctionnelle après lésion de la moelle épinière. Les souris CX3CR1 ont été choisies puisqu'elles expriment l'eGFP dans les microglies et monocytes, ce qui permet l'observation directe de ces cellules sous microscope à fluorescence.

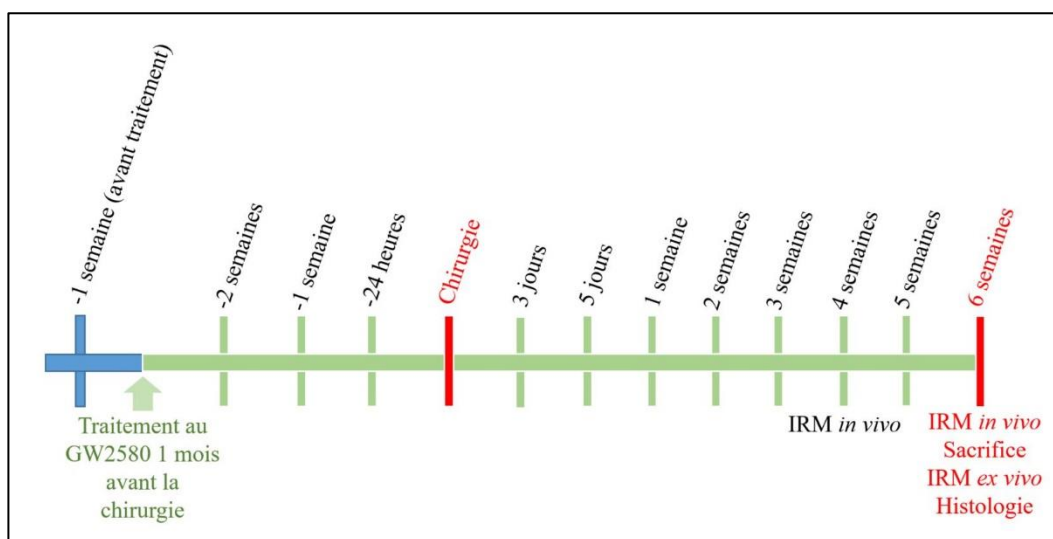


Figure 152 : Suivi comportemental des animaux des groupes CTL et GW2580 de 1 mois avant la chirurgie et jusqu'à 6 semaines après la lésion. Une IRM in vivo est effectuée à 4 et 6 semaines, puis une IRM ex vivo est effectuée à 6 semaines. Après le sacrifice des animaux, les analyses histologiques sont ensuite effectuées.

Pour étudier l'effet de la déplétion de la prolifération des microglies dans le contexte de LME, nous avons administré par voie orale 150mg/kg/j de GW2580 chez des souris CX3CR1. Les souris ont été traitées quotidiennement 4 semaines avant une hémisection latérale de la moelle épinière au niveau thoracique 9 et jusqu'à 6 semaines après la lésion (Fig. 152).

3.9.1 Diminution de la prolifération microgliale

Sur un premier groupe, nous avons étudié l'effet du blocage de CSFR1 via le GW2580 sur le nombre de microglies et sur la prolifération cellulaire en utilisant des injections de BrdU chez des animaux non lésés et des animaux lésés (analyse 2 semaines après la chirurgie).

Chez les animaux lésés, les microglies (cellules eGFP positives), les cellules proliférantes (cellules BrdU positives) et la microglie proliférante (cellules eGFP positives/BrdU positives) ont été comptées dans le groupe CTL et le groupe GW2580 deux semaines après la chirurgie. La quantification a été faite en rostral et en caudal par rapport au site de la lésion, ainsi que du côté controlatéral à l'épicentre. Le nombre de microglies (eGFP+) et de cellules proliférantes (BrdU+) n'est pas différent entre les groupes GW2580 et CTL. Le nombre de microglies proliférantes (cellules eGFP+/BrdU+) est significativement réduit dans le groupe GW2580 par rapport au groupe CTL (Fig. 153A-E). La diminution est plus importante proche de l'épicentre, ipsilatéral à la lésion, avec une réduction allant jusqu'à 60%. En effet, le nombre de cellules est de 192.6 cellules/mm² pour le groupe contrôle, contre 75.8 cellules/mm² dans le groupe GW2580 (Fig. 153B).

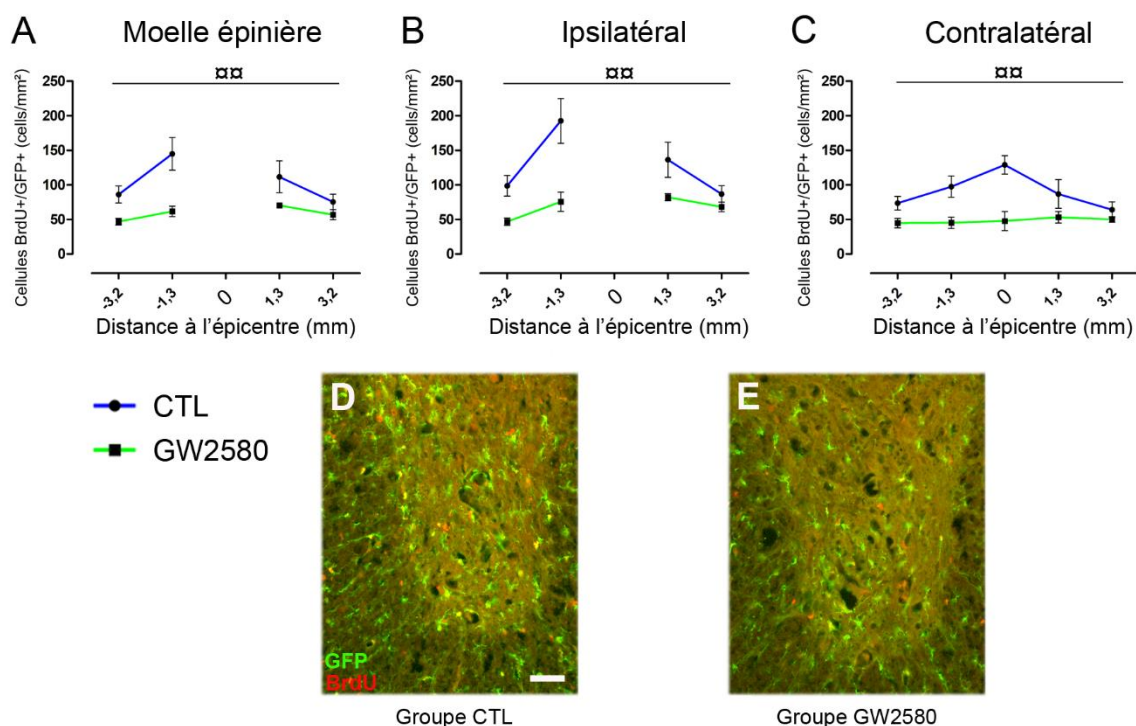


Figure 153 : Quantification des cellules BrdU/eGFP-positives du groupe CTL (ligne bleue) et GW2580 (ligne verte) dans la totalité de la moelle épinière (A), du côté de la lésion (B) et du côté opposé à la lésion (C). Cornes ventrales de la moelle épinière du groupe CTL (D) et du groupe GW2580 (E) marquées par immunofluorescence. ANOVA 2 voies : $\alpha\alpha p < 0.01$. Echelle (D-E) : 50 μ m.

Conclusion : le traitement au GW2580 n'a pas modifié le nombre total de microglies 2 semaines après une lésion médullaire, mais a fortement diminué le nombre de microglies proliférantes. Ainsi, le blocage de CSF1R en utilisant GW2580 inhibe spécifiquement la prolifération microgliale après une LME.

3.9.2 Analyse comportementale

Nous avons ensuite étudié le potentiel effet de l'inhibition du CSF1R par le GW2580, entraînant la réduction de la prolifération microgliale sur la récupération motrice après une lésion médullaire. De la même manière que pour l'étude précédente, le côté gauche de la moelle épinière au niveau thoracique 9 (T9) est sectionné, induisant ainsi des altérations motrices et sensibles de la patte postérieure gauche. Le traitement au GW2580 n'a eu aucun effet sur le poids de l'animal et sur la prise de nourriture avant et après la chirurgie.

Le suivi post-lésionnel de 6 semaines effectué avec l'Open field n'a révélé aucune différence de comportement anxieux entre les deux groupes, reflété par le temps passé par zone (centre et périphérie, Fig. 154A) et le temps d'immobilité des souris (Fig. 154B).

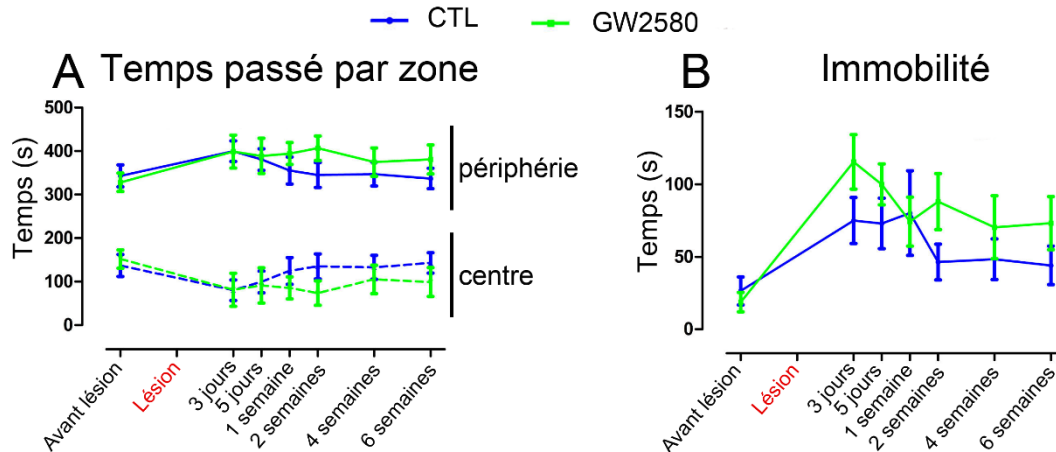


Figure 154 : Analyse comportementale en Open field entre le groupe CTL (bleu) et le groupe GW2580 (vert) évaluant le temps passé par zone (carré central et périphérie, A), et sur le temps total d'immobilité (B) pendant 6 semaines.

L'analyse dynamique des patrons de marche en utilisant le CatWalk™ confirme que la vitesse moyenne pour traverser la plaque de verre est similaire entre les souris CTL et les souris GW2580. L'analyse avec le CatWalk™ permet également d'étudier plusieurs paramètres des empreintes individuelles de chaque patte.

Pour fournir une analyse plus approfondie, nous avons analysé le paramètre "max contact", qui correspond à la durée de détection maximale d'une patte lors d'un pas. Le paramètre "max contact %" est le temps de contact maximum par rapport au temps de pose de patte lors d'un pas. Ce paramètre correspond donc à la transition entre la phase d'arrêt et de propulsion de la souris. Le paramètre « max contact % » a donc été comparé avant et après chirurgie dans les deux groupes de souris. Nous avons aussi analysé l'angle de pose des pattes par rapport au sens de marche, que nous avons aussi comparé aux valeurs obtenues avant chirurgie.

Le paramètre "max contact %" de la patte avant droite est significativement plus grand en comparaison des valeurs obtenues avant la chirurgie dans le groupe CTL. Au contraire, dans le groupe GW2580, ce paramètre est identique à la valeur avant chirurgie (ANOVA 1 voie, $p < 0,001$, Fig. 155A). De même, l'angle de la patte des membres antérieurs (moyenne des deux pattes avant) n'est pas modifié par la lésion médullaire dans le groupe GW2580, alors qu'il diminue dans le groupe témoin (ANOVA 1 voie, $p < 0,001$, Fig. 155B).

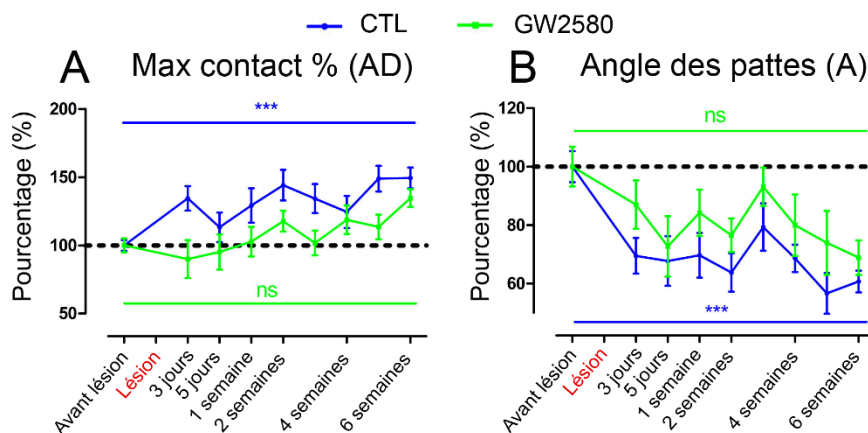


Figure 155 : Analyse CatWalk™ comparant la marche dans le groupe GW2580 (vert) par rapport au groupe CTL (bleu). Les paramètres analysés sont le "max contact %" de la patte avant droite (A) et de l'angle de patte des pattes avant (moyenne des deux pattes avant) (B). ANOVA 1 voie : *** $p < 0.001$.

Conclusion : ces résultats démontrent tout d'abord que le traitement au GW2580 n'a aucun effet sur le comportement anxieux ainsi que sur l'activité motrice spontanée après une LME. Deuxièmement, l'étude de plusieurs paramètres de positionnement des pattes après lésion médullaire suggère une amélioration de la fonction locomotrice fine suite au traitement GW2580 après une lésion médullaire. Ces résultats suggèrent donc que le traitement au GW2580 induit des mécanismes compensatoires conduisant à une meilleure récupération de la fonction motrice fine après une LME.

3.9.3 Mesure du volume lésionnel en IRM pondérée en diffusion *in et ex vivo* et en histologie

a) IRM *in vivo*

Pour examiner l'effet potentiel d'une prolifération réduite des microglies sur l'évolution de la lésion, nous avons réalisé une analyse longitudinale en IRM *in vivo* pondérée en diffusion dans les groupes GW2580 et CTL à 4 et 6 semaines après la lésion.

Comme dans l'étude précédente (3.8.1), les tissus altérés sont identifiés par un hyposignal du côté lésé de la moelle épinière qui contraste avec l'hypersignal normal de la substance grise observé du côté opposé de la lésion. La quantification de la surface de la lésion est effectuée sur chaque section par segmentation manuelle de la totalité de la moelle épinière, des substances blanches et grises préservées et des tissus lésés.

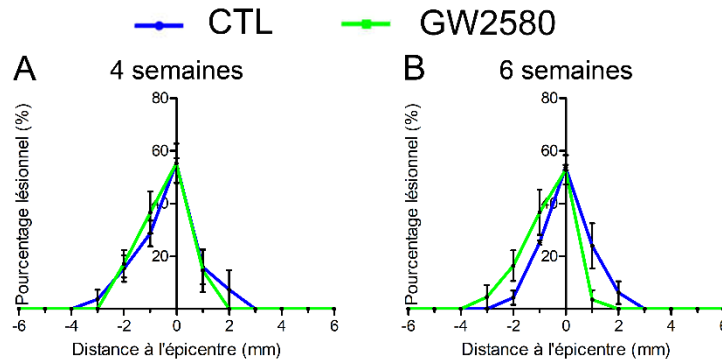


Figure 156 : Quantification de la lésion à 4 (A) et 6 semaines (B) en IRM *in vivo* pondérée en diffusion sur les groupes GW2580 (vert) et CTL (bleu).

La comparaison entre le groupe GW2580 et le groupe CTL ne montre aucune différence entre le pourcentage de tissus endommagés à l'épicentre de la lésion, le volume lésionnel ni dans l'extension de la lésion sur l'axe rostro-caudal à 4 et à 6 semaines (Fig. 156).

b) IRM *ex vivo*

Nous avons ensuite acquis des images *ex vivo* pondérées en diffusion pour discriminer plus précisément les tissus lésés de la moelle épinière. Pour cela, nous avons utilisé notre antenne dédiée précédemment présentée et le protocole pondéré en diffusion (facteur $b = 500\text{mm}^2/\text{s}$). Les acquisitions ont été faites à 6 semaines, ce qui correspond à la fin de l'expérience. Nous avons aussi imagé en *ex vivo* les moelles épinières du groupe utilisé pour l'étude de la prolifération microgliale avec des injections au BrdU 2 semaines après la chirurgie (3.10.1).

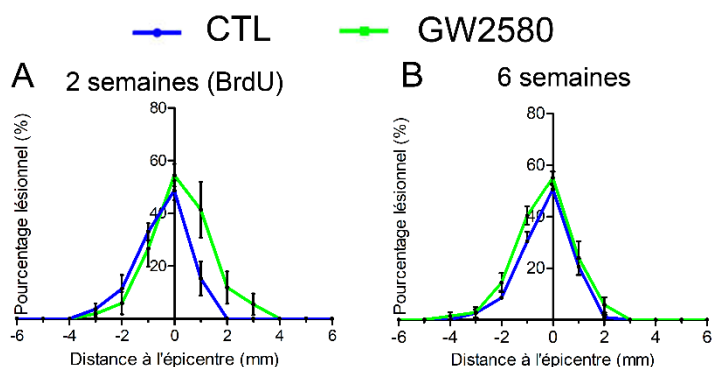


Figure 157 : Quantification de la lésion à 2 semaines sur le groupe permettant d'investiguer la prolifération microgliale (A) et à 6 semaines (B) en IRM *ex vivo* pondérée en diffusion sur les groupes GW2580 (vert) et CTL (bleu).

La comparaison entre le groupe GW2580 et le groupe CTL ne montre aucune différence entre le pourcentage de tissus endommagés à l'épicentre de la lésion, le volume lésionnel ni dans l'extension de la lésion sur l'axe rostro-caudal à 2 et à 6 semaines (Fig. 157).

Nous avons ensuite quantifié l'extension de la lésion et le volume lésionnel en utilisant une coloration au bleu de toluidine sur les mêmes moelles épinières à 2 semaines et à 6 semaines après la lésion. En accord avec les résultats IRM *in vivo* et *ex vivo* nous n'avons pas observé de différence entre les souris GW2580 et les souris CTL. De plus, les coefficients de corrélation de Spearman montrent qu'il n'y a pas de différence entre les modalités.

Conclusion : les résultats d'analyse en IRM *in* et *ex vivo*, ainsi qu'en histologie classique démontrent que le traitement au GW2580 n'a pas modifié l'extension de la lésion et le volume sur une période de 6 semaines après une hémisection de la moelle épinière.

3.9.4 Mesure du coefficient de diffusion apparent parallèle

Afin d'obtenir plus d'information sur la réorganisation du tissu, et plus précisément sur l'intégrité axonale, nous avons choisi de mesurer le coefficient de diffusion apparent parallèle des deux groupes de souris. Pour cela, nous avons comparé les ADC// des 12 souris GW2580 et des 12 souris CTL en IRM *ex vivo*, 6 semaines après la chirurgie. Pour pouvoir prendre en compte l'impact de la lésion médullaire sur l'ADC//, nous avons exprimé les valeurs obtenues dans un contexte lésé en fonction des valeurs obtenues dans un contexte non lésé (pour les deux conditions GW2580 et CTL). Les quantifications sont effectuées avec la segmentation automatique (3.7.5) de la substance grise et blanche sur l'ensemble de la moelle épinière. La zone lésée ne pouvant être segmentée automatiquement, les coupes présentant la lésion sont exclues de la quantification.

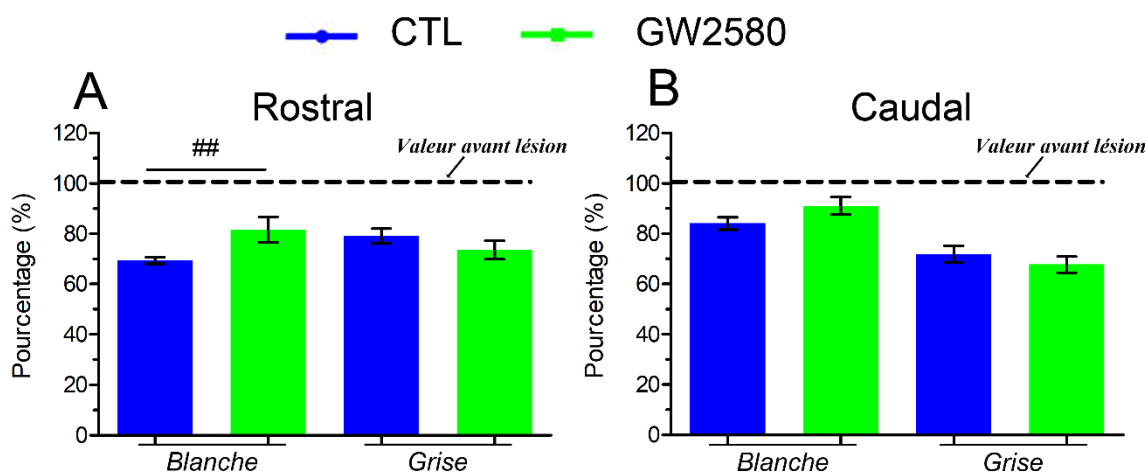


Figure 158 : Quantification des ADC// rostral (A) et caudal à la lésion (B). Les valeurs d'ADC// des souris GW2580 (vert) et des souris CTL (bleu) sont exprimées en pourcentage des ADC// dans un contexte non lésé (barre noire en tiret). Les quantifications ont été faites sur l'ensemble de la moelle épinière, sur 3.6 mm de distance rostro-caudale. T-test : ## $p < 0.01$.

L'ADC// du groupe GW2580 est significativement plus important que l'ADC// du groupe CTL dans la partie rostrale de la substance blanche (t-test, Fig. 158A). En effet, l'ADC// dans la substance blanche du groupe GW2580 atteint $13.04 \times 10^{-4} \text{ mm}^2/\text{s}$, contre $11.75 \times 10^{-4} \text{ mm}^2/\text{s}$ dans le groupe CTL (Tab. 31 et 32). Néanmoins, aucun des deux ADC// n'atteint la valeur avant la chirurgie.

ADC// rostral (mm^2/s)	HS – CTL	HS – GW2580	NL – CTL	NL – GW2580
Substance grise	6.41 ± 0.17	5.95 ± 0.15	8.02 ± 0.33	8.35 ± 0.33
Substance blanche	11.75 ± 0.31	13.04 ± 0.27	16.54 ± 0.27	16.12 ± 0.59

Tableau 30 : Coefficient de diffusion parallèle dans la partie rostrale de la moelle épinière, dans diverses conditions (HS : Hémisection ; NL : Non-lésé)

ADC// caudal (mm^2/s)	HS – CTL	HS – GW2580	NL – CTL	NL – GW2580
Substance grise	5.51 ± 0.12	5.58 ± 0.19	8.33 ± 0.80	8.50 ± 0.26
Substance blanche	12.25 ± 0.26	13.39 ± 0.51	15.68 ± 0.48	15.32 ± 0.61

Tableau 31 : Coefficient de diffusion parallèle dans la partie caudale de la moelle épinière, dans diverses conditions (HS : Hémisection ; NL : Non-lésé)

Conclusion : le traitement au GW2580 a eu un effet sur la diffusivité axiale dans la substance blanche située en rostral à la lésion des souris traitées 6 semaines après la lésion, ce qui pourrait refléter une meilleure intégrité axonale, même si les mesures n'atteignent pas les valeurs d'un contexte sain.

3.9.5 Réactivité gliale

Pour étudier l'impact de la prolifération réduite des microglies au niveau cellulaire, nous avons quantifié la réactivité gliale après LME en utilisant les marqueurs IBA1 et GFAP. Nous avons analysé les souris CTL et les souris GW2580 à 2 semaines et à 6 semaines après une hémisection latérale de la moelle épinière. Pour déterminer les changements induits par la lésion dans l'expression des protéines, la densité optique moyenne (DO) a été mesurée en rostral et en caudal à la lésion dans tous les groupes.

a) **Microglie:**

Rostral et caudal à la lésion, les quantifications en DO des marquages sur les coupes de moelles épinières de souris traitées avec du GW2580 ont montré une diminution de l'expression d'IBA1 dans la substance grise, dans la substance blanche et dans le *funiculus* dorsal par rapport aux souris CTL.

En effet, 2 semaines après la chirurgie, le groupe GW2580 a montré une diminution de la réactivité microgliale en rostral au site de lésion dans la substance grise (Fig. 159A), en caudal dans la substance blanche (Fig. 159B) et des deux côtés de la lésion dans le *funiculus* dorsal (Fig. 159C). À 6 semaines après la lésion, le traitement au GW2580 a induit une diminution généralisée de l'immunoréactivité de l'IBA1 à travers la moelle épinière à la fois en rostral et en caudal par rapport au site de la lésion (Fig. 159D-F).

b) **Astrocytes :**

Les groupes GW2580 ont également présenté une légère diminution de l'expression de GFAP par rapport au groupe CTL dans la moelle épinière. Deux semaines après la lésion, le groupe traité au GW2580 montre une diminution de la réactivité astrocytaire en rostral par rapport au site de lésion dans la substance blanche (Fig. 159B) et dans le *funiculus* dorsal (Fig. 159C). Six semaines après la lésion, l'analyse quantitative a révélé une diminution significative de l'expression de GFAP dans le groupe GW2580 comparé au groupe CTL en caudal à la lésion dans la substance blanche (Fig. 159E) et des deux côtés de la lésion dans le *funiculus* dorsal (Fig. 159F).

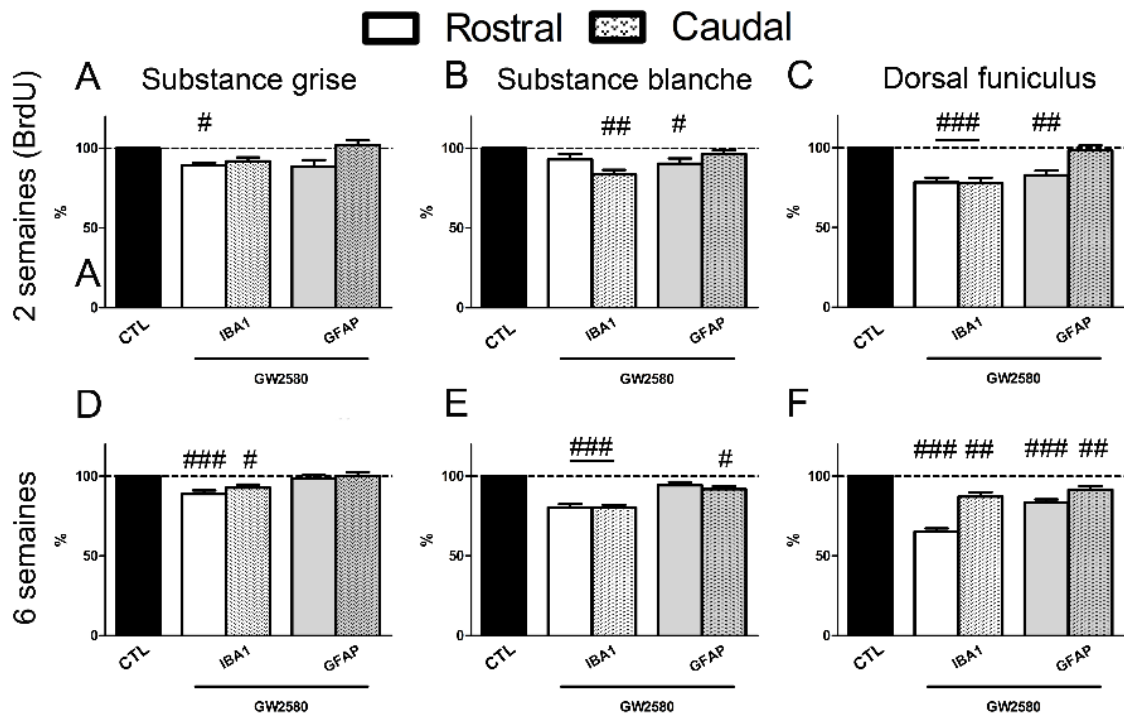


Figure 159 : Quantifications montrant les densités optiques IBA1 (graphe blanc) et GFAP (graphe gris) chez les souris GW2580 et CTL à 2 semaines (A-C) et à 6 semaines après LME (D-F) dans la substance grise (A & D), la substance blanche (sans le funiculus dorsal) (&E) et dans le funiculus dorsal (C&F). T-test : # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$.

Conclusion : ces données suggèrent que l'inhibition par GW2850 de la prolifération des microglies dans un contexte de LME diminue la réactivité microgliale et astrocytaire. De plus, les diminutions de réactivité gliale étaient plus prononcées à 6 semaines qu'à 2 semaines après la lésion médullaire.

3.9.6 Cavitations

Les microcavités et les zones de lésions nécrotiques sont notamment constituées de cellules inflammatoires entourées d'astrocytes réactifs et sont couramment observées chez les patients atteints de lésion médullaire, mais aussi dans certains modèles animaux. Étant donné que l'inhibition de la prolifération microgliale induite par le GW2580 réduit la gliose, nous avons finalement examiné les conséquences de cette inhibition sur la préservation des tissus après une hémisection latérale (Fig. 160).

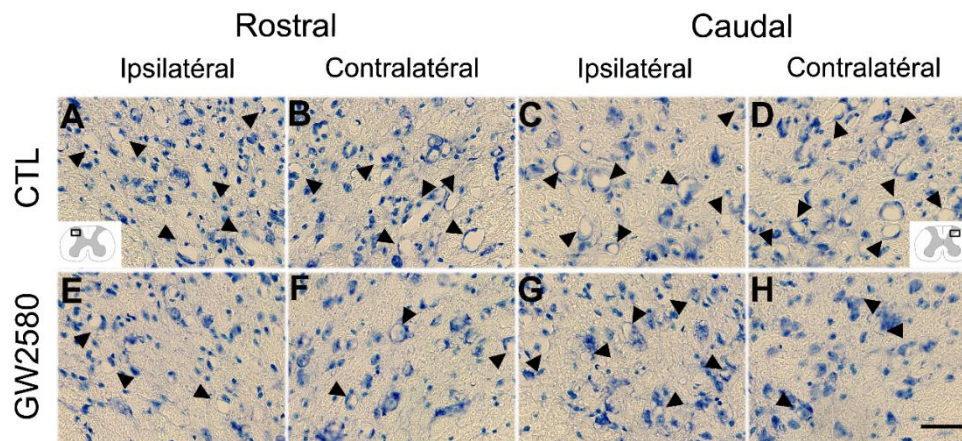


Figure 160 : Photographies des sections transversales de la moelle épinière marquées au bleu de toluidine dans la corne dorsale des groupes CTL(A-D) et GW2580 (E-F) prises en rostral (ipsilatérales (A & E) et controlatérales (B & F)) et en caudal (ipsilatérales (C & G) et controlatérales (D & H)). Echelle (A-H) : 40µm.

Pour cela, nous avons évalué la surface occupée dans la substance grise par des microcavités dans des coupes colorées au bleu de toluidine à 6 semaines après la lésion à la fois en rostral et en caudal par rapport à la lésion chez les animaux CTL et GW2580 (Fig. 161).

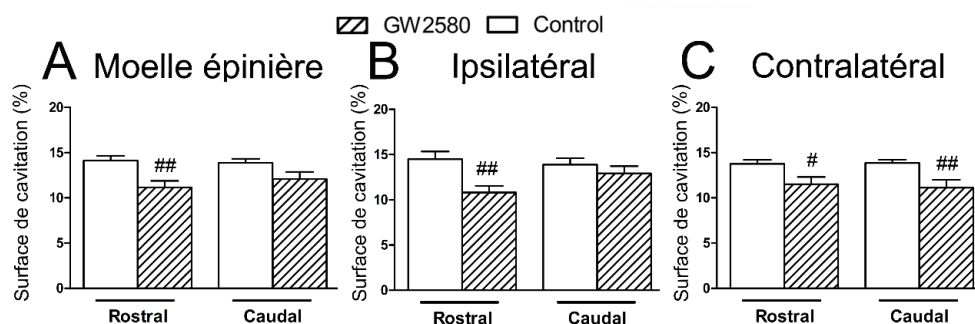


Figure 161 : Quantifications des pourcentages de cavitation dans la substance grise des groupes CTL (graphe blanc) et GW2580 (graphe rayé) 6 semaines après une LME (A-C). Les cavitations ont été exprimées en pourcentage de la surface totale de la substance grise sur une distance rostro-caudale de 2,5 mm de l'épicentre de la lésion, dans toute la moelle épinière (A), du côté de la lésion (B) et le côté opposé à la lésion (C). T-test : # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$.

Nous avons identifié une diminution de la formation de microcavités dans l'ensemble de la substance grise dans le groupe GW2580 par rapport au groupe CTL au-dessus du site de la lésion (Fig. 161A). Pour approfondir notre analyse, nous avons analysé séparément les côtés ipsilatéraux et controlatéraux à la lésion de la moelle épinière. En rostral à la lésion, le traitement GW2580 a induit une plus forte diminution de la formation des microcavités sur le côté ipsilatéral que sur le côté controlatéral de la moelle épinière (Fig. 161B). En caudal à la lésion, le traitement par GW2580 a réduit la formation de microcavités seulement du côté controlatéral de la moelle épinière lésée (figures 161C).

Conclusion : ces résultats montrent que le traitement au GW2580 a réduit la formation de microcavités, ce qui suggère que l'inhibition de la prolifération des microglies après une lésion médullaire favorise la préservation des tissus à proximité de la lésion.

L'effet du GW2580 étant démontré grâce à cette étude, il est désormais nécessaire d'amorcer une approche plus clinique du traitement. En effet, dans cette étude, le traitement est donné avant le traumatisme médullaire. Pour se rapprocher des conditions cliniques, il faudrait administrer le traitement après la lésion (Fig. 162). Dans une prochaine étude, le GW2580 sera administré juste après avoir effectué l'hémisection de la moelle épinière, un groupe de souris sera traité au GW2580 et un groupe de souris ne sera pas traité. Les souris seront suivies de la même manière (analyse comportementale, IRM, histologie) que pour l'étude précédemment décrite, afin de pouvoir comparer les effets du traitement au GW2580 avant et après lésion médullaire.

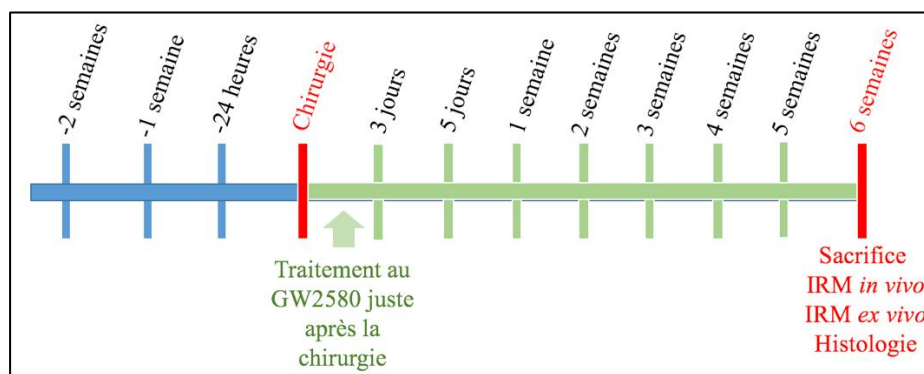


Figure 162 : Temps d'analyse comportementale du protocole évaluant l'effet du traitement au GW2580 lorsqu'il est donné après une hémisection latérale de la moelle épinière.

3.10 Mise au point d'un nouveau modèle de lésion de la moelle épinière sur le primate non-humain

Dans une première série d'expériences utilisant deux microcèbes, nous avons mis au point le protocole chirurgical, les évaluations comportementales et le suivi en IRM *in vivo* pondérée en T2. Dans une seconde série d'expérience, 3 animaux supplémentaires ont été évalués en utilisant des tests comportementaux et un suivi longitudinal en IRM *in vivo* à 48 h, et 1, 4 et 12 semaines après lésion médullaire (Fig. 163). L'hémisection de la moelle épinière a été faite au niveau lombaire 1 pour obtenir une monoplégie du membre postérieur ipsilatérale à la lésion tout en préservant le fonctionnement vésical. Tous les animaux ont survécu à la chirurgie et aux anesthésies répétées dues au suivi longitudinal *in vivo* en IRM.

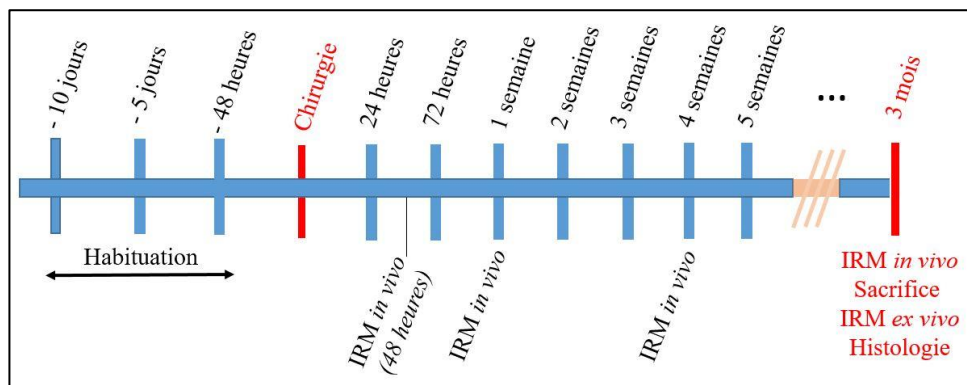


Figure 163 : Temps d'analyse de l'étude sur les *Microcebus murinus*. Trois temps sont choisis pour habituer les animaux avant la chirurgie en comportement. A partir d'une semaine en postopératoire, l'analyse est faite une fois par semaine jusqu'à 3 mois après la lésion.

3.10.1 Caractérisation neuroanatomique de la moelle épinière de *Microcebus murinus*

Pour mieux caractériser le rachis et la moelle épinière de *Microcebus murinus*, nous avons d'abord réalisé un scanner pour illustrer l'organisation du squelette et, en particulier, des vertèbres (Fig. 164A&B). La moelle épinière a ensuite été disséquée (Fig. 164C-E) et imagée en utilisant un IRM *ex vivo* pondérée en diffusion (Fig. 164F-I). Ensuite, nous avons coupé au cryostat la moelle épinière d'un microcèbe et effectué des marquages histologiques classiques, le violet de crésyl (Fig. 164J-M) et le bleu de toluidine (Fig. 164N-Q) à différents niveaux sur l'axe rostro-caudal.

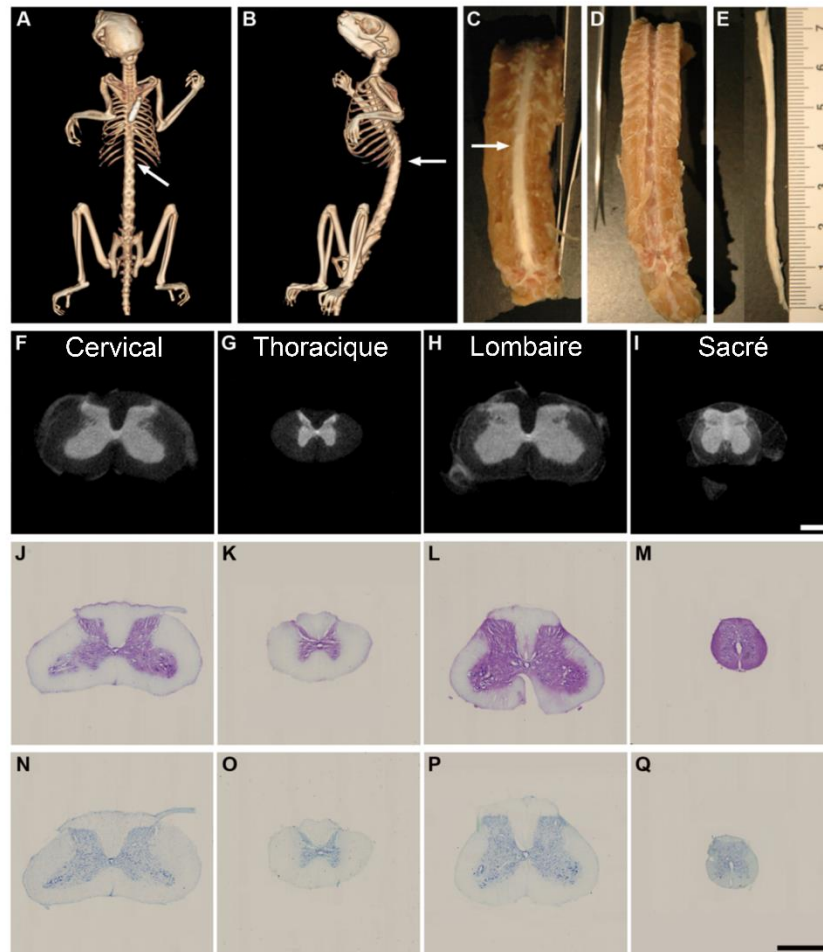


Figure 164 : Mini-atlas du rachis et de la moelle épinière de microcèbe. Images de tomographie dorsale (A) et latérale (B). Colonne vertébrale après le retrait de toutes les lames postérieures des vertèbres (C). Les flèches dans (A-C) indiquent le niveau L1. Colonne vertébrale après dissection (D) de la moelle épinière (E). IRM transversales pondérée en diffusion au niveau cervical (F), thoracique (G), lombaire (H) et sacré (I). Colorations au Crésyl-violet (J-M) et au bleu de toluidine (N-Q) au niveau cervical (J, N), thoracique (K, O), lombaire (L, P), et sacré (M, Q). Echelles (F-I) : 800 μ m; (J-Q) : 1mm.

Nous avons ensuite examiné la moelle épinière de microcèbe et comparé les caractéristiques neuroanatomiques aux niveaux thoraciques inférieurs et lombaires supérieurs avec ceux des souris et des humains. La coloration au bleu de toluidine a été utilisée pour l'histologie générale, plus spécifiquement pour colorer les noyaux et analyser leur distribution dans les substances grises et blanches de la moelle épinière. Nous avons utilisé 8 souris, 3 microcèbes et 15 moelles épinières humaines pour comparer la distribution des substances grise et blanche. Pour toutes les espèces, nous avons analysé un segment de moelle épinière d'au minimum 300 μ m de long avec des sections de 14 μ m.

Nous avons observé une variation significative des proportions des substances grise et blanche entre les 3 espèces. La quantification de la surface des substances grise et blanche a révélé un ratio substance blanche-substance grise plus élevé chez les primates que chez les rongeurs. Nous n'avons pas observé de différence significative entre le microcèbe et l'Homme (Fig. 165D-F).

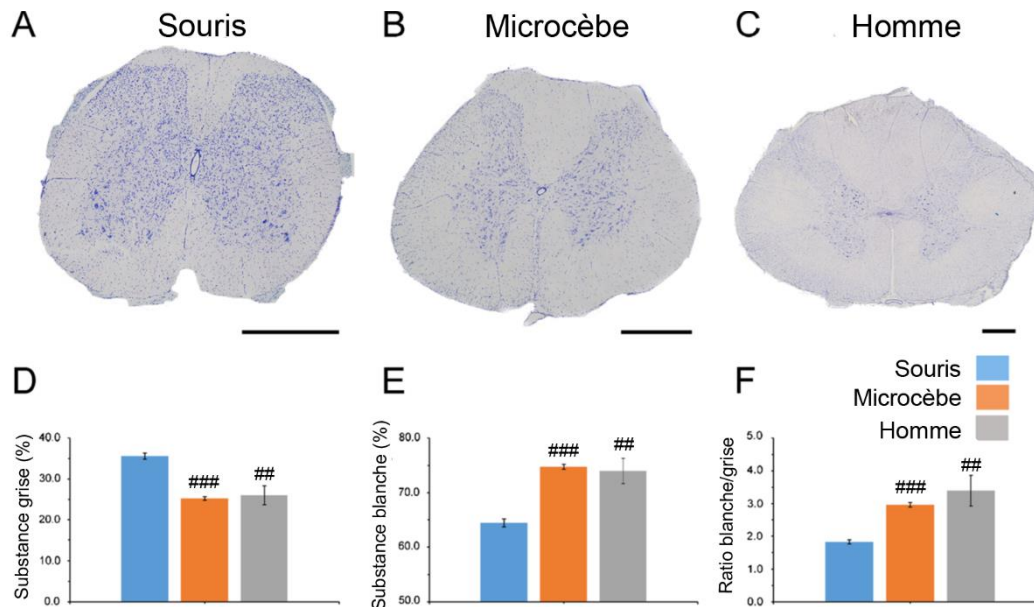


Figure 165 : Caractéristiques neuroanatomiques entre les moelles épinières de souris, de microcèbe et d'Homme. Photographies à fond clair présentant des différences dans les caractéristiques neuroanatomiques entre la souris (A), le microcèbe (B), et des moelles épinières humaines (C) au niveau thoracique bas en utilisant la coloration au bleu de toluidine. Echelle : 1mm. (D-F). T-test non apparié : ## $p < 0.01$ et ### $p < 0.001$.

Nous avons ensuite caractérisé la distribution et la morphologie des microglies et des astrocytes dans la moelle épinière chez les trois espèces (Fig. 166 et 167). L'expression d'IBA1 a démontré une distribution microgliale hétérogène, avec une densité plus élevée dans la substance grise pour les trois espèces (Fig. 166A-C). Chez la souris, sur le plan morphologique, les microglies exprimant IBA1 ont des petits corps cellulaires et des ramifications de taille petite à moyenne ; elles sont distribuées aléatoirement à la fois dans la substance grise et la blanche (figure 166D, flèche).

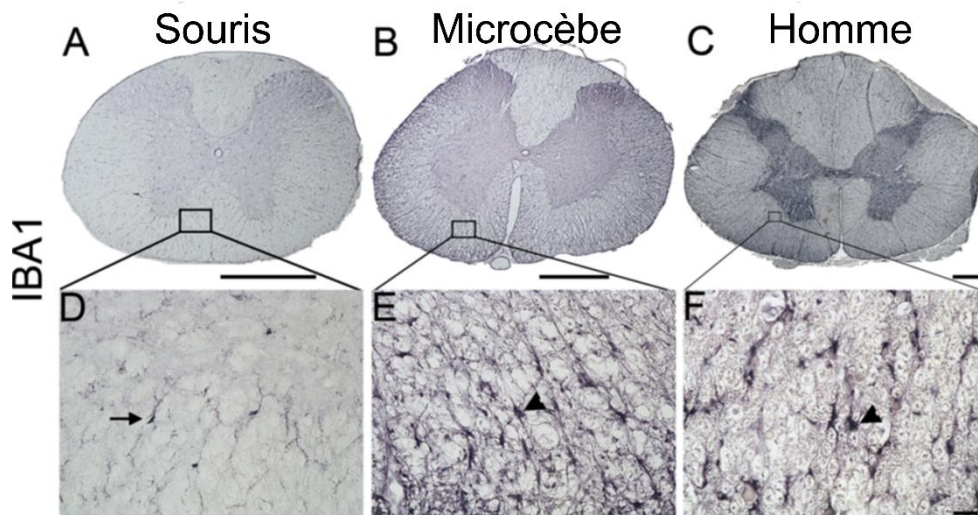


Figure 166 : Photographies à fond clair montrant la distribution/morphologie des microglies chez la souris (A&D), le microcèbe (B&E) et l'Homme (C&F) en utilisant un marquage IBA1. Echelle (A-C): 1mm, (D-F): 25 μ m.

Les microglies exprimant IBA1 chez le microcèbe et l'Homme, sont plus larges, avec des corps cellulaires plus grands et des ramifications plus épaisses (Fig. 166E-F, flèches).

L'expression de la GFAP a révélé une densité plus élevée d'astrocytes dans la substance blanche que dans la substance grise dans les trois espèces (Fig. 167A-C). Chez la souris, dans la substance grise, les astrocytes présentent une forme étoilée avec de nombreuses ramifications qui ne se chevauchent pas. Dans la substance blanche, les astrocytes présentent une morphologie allongée avec des ramifications qui se chevauchent (Fig. 167D, flèche).

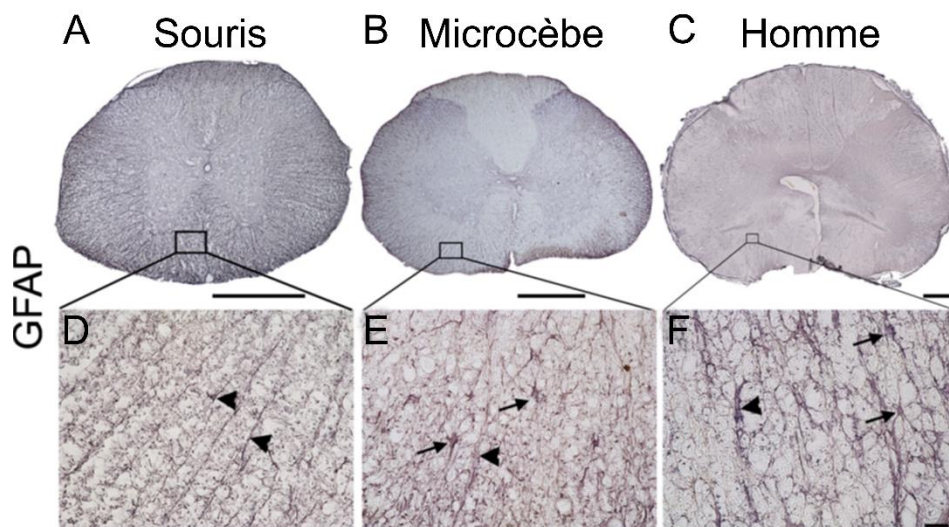


Figure 167 : Photographies à fond clair montrant la distribution/morphologie des astrocytes chez la souris (A&D), le microcèbe (B&E) et l'Homme (C&F) en utilisant un marquage GFAP. Echelle (A-C): 1mm, (D-F): 25 μ m.

Les astrocytes exprimant GFAP dans la substance blanche chez le microcèbe et l'Homme présentent à la fois des morphologies étoilées et allongées (Fig. 167E&F, flèches). De plus, ces astrocytes ont des corps cellulaires plus larges et présentent des ramifications plus épaisses (Fig. 167E-F, pointes de flèche).

La connaissance anatomique de la moelle épinière chez *Microcebus murinus* est extrêmement limitée, une étude seulement a rapporté que le développement précoce du tube neural est similaire entre le microcèbe et l'Homme (Muller F, 1980).

Dans la moelle épinière adulte, nous avons montré que le ratio substance blanche-gris était non seulement similaire entre le microcèbe et les humains, mais que les deux étaient également significativement plus élevés que chez les rongeurs. Ceci est cohérent avec une étude précédente dans le néocortex montrant que la substance blanche constitue environ 10%, 50% et 55% du volume total chez les souris, les lémurins et les humains, respectivement (Zhang and Sejnowski 2000). La substance blanche contient des corps cellulaires non neuronaux et des axones; un pourcentage plus élevé de substance blanche chez les primates que chez les rongeurs peut donc résulter d'une augmentation de la proportion axonale (Herculano-Houzel 2014). Le ratio substance blanche/grise plus élevé peut également résulter de plusieurs autres paramètres, notamment le nombre, la densité et la taille des cellules gliales, mais aussi le degré de myélinisation axonale et les différences de calibre axonal. Nous avons ainsi observé que les microglies et les astrocytes sont plus gros et présentent des ramifications plus épaisses chez le microcèbe et chez l'Homme que chez les souris. De plus, une étude dans le néocortex rapportant que les astrocytes protoplasmiques et fibreux humains ont un diamètre plus important que ceux des rongeurs (Oberheim et al. 2009).

Cependant, il est impératif de prendre en compte la projection du tractus corticospinal, et donc le contrôle cortical des mouvements des membres supérieurs diffère de façon importante entre les espèces de primates (Courtine et al. 2007; Nakajima et al. 2000).

Conclusion : ces résultats montrent que la moelle épinière de *Microcebus murinus* présente un ratio substance blanche/grise et une morphologie de cellules gliales qui ressemblent étroitement à ceux de la moelle épinière humaine.

3.10.2 Caractérisation de la répercussion motrice d'une hémisection latérale de la moelle épinière chez *Microcebus murinus*

Nous avons évalué la faisabilité de 3 tests différents pour l'évaluation de la fonction motrice chez le microcèbe après une lésion médullaire, l'Open field, le « Grip test » et les analyses CatWalk™.

Le test en Open field (2.8.3) a montré que le score moteur du membre postérieur ipsilatéral à la lésion est passé d'un score de 6 (marche normale) à 0-1 (mouvement nul ou à peine perceptible), jusqu'à 6 jours après la chirurgie (Fig. 168A). Entre 6 et 14 jours après la lésion, le score global montre une récupération fonctionnelle graduelle suivie d'une stabilisation à environ 80% du score initial. Pour les 3 animaux, le membre controlatéral présente une atteinte transitoire jusqu'au 30^{ème} jour post-lésion. A partir du 33^{ème} jour après la lésion, 2 microcèbes sont revenus à une valeur normale, tandis que le dernier est resté à un score de 5.5, ce qui correspond à un déficit très léger (Fig. 168A). L'analyse statistique a montré une différence significative entre les deux pattes arrières jusqu'à 6 jours après la lésion.

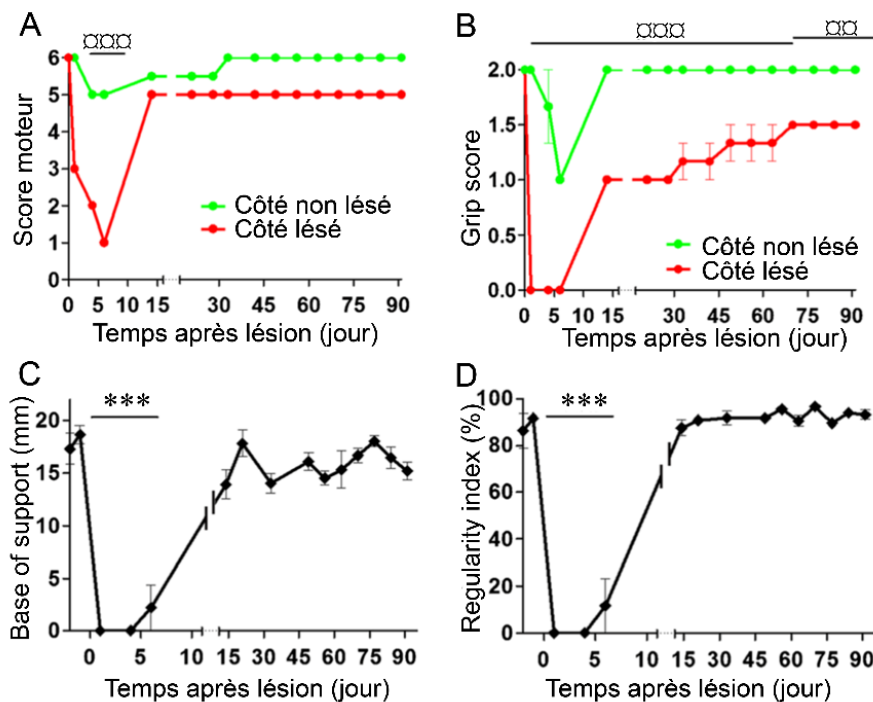


Figure 168 : Caractérisation de la récupération fonctionnelle après une hémisection latérale de la moelle épinière chez *Microcebus murinus* pendant 3 mois. Graphes montrant l'évolution des scores moteurs (A) du « grip score » (B) des membres postérieurs ipsilatéraux et controlatéraux à la lésion. Graphiques montrant les changements dans le « base of support » (C) et le « regularity index » (D). ANOVA 1 voie *** $p < 0.001$, ANOVA 2 voies ^{***} $p < 0.01$, ^{****} $p < 0.001$.

Pour évaluer la fonction motrice fine, nous avons utilisé le grip test (2.8.3). Le score des orteils postérieurs ipsilatéraux à la lésion a chuté à 0 pendant les 6 jours suivant la chirurgie, ce qui correspond à une absence de préhension, par rapport à la préhension normale (score de 2, Fig. 168B). Ensuite, une récupération progressive, mais partielle, a été observée avant de plafonner pour tous les animaux à 75% de leur score initial de 70 à 90 jours après la lésion médullaire. Le membre controlatéral présentait une altération transitoire pendant 6 jours après la chirurgie, et est ensuite revenu à une valeur de préhension normale au 14^{ème} jour chez tous les animaux (Fig. 168B). L'analyse statistique a révélé une différence significative entre les deux membres postérieurs jusqu'à 90 jours après le traumatisme.

Pour mieux quantifier les déficits de marche, nous avons également effectué une analyse automatisée de la marche en utilisant des enregistrements CatWalkTM (Fig. 168C&D). Sur l'ensemble des paramètres évalués, nous avons choisi de nous intéresser à un paramètre de marche dynamique et à un paramètre statique. Nous avons choisi le paramètre « base of support », qui correspond à la largeur entre les deux pattes arrière (Fig. 168C), et le « regularity index », qui mesure la coordination entre les pattes (Fig. 168D). Entre le 1^{er} et le 4^{ème} jour après la lésion, les paramètres dynamiques et statiques ont diminué à 0 pour tous les animaux et ont ensuite augmenté progressivement dans les 14 jours suivant l'hémisection médullaire latérale. Le « base of support » et l'index de régularité sont restés significativement plus faible qu'avant la chirurgie jusqu'au 14^{ème} jour.

Nous avons choisi une hémisection latérale de la moelle épinière pour plusieurs raisons. Tout d'abord, chez l'Homme, la proportion de lésions complètes de la moelle épinière diminue (Devivo 2012); deuxièmement, une hémisection latérale de la moelle épinière chez le macaque permet un contrôle reproductible et précis de la localisation et de l'étendue de la lésion (Nout et al. 2012); et troisièmement, une section incomplète chez le primate non-humain permet la préservation des fonctions physiologiques critiques (par exemple, les fonctions de contrôle des sphincters de la vessie et de l'intestin) et réduit ainsi les impacts nuisibles sur la santé de l'animal (Courtine et al. 2007). Enfin, de manière plus générale, les tissus épargnés jouant un rôle essentiel dans la plasticité locale et l'inflammation, une lésion incomplète permet la mise en place de plasticité post lésionnelle (Nardone et al. 2017) et peut être ainsi de fournir une piste pour évaluer des stratégies thérapeutiques favorisant la « repousse » des axones épargnés (Courtine et al. 2007).

La quadrupédie chez les primates, particulièrement chez le microcèbe, est bien adaptée pour marcher sur les branches et diffère des autres mammifères puisqu'ils préfèrent une séquence diagonale à une séquence latérale (Shapiro et al. 2014). L'analyse de la séquence de locomotion chez des primates lésés médullaires marchant à quatre pattes avait été faite précédemment soit sur tapis roulant (Rosenzweig et al. 2010) soit dans un couloir de marche (Ma et al. 2016). Le système CatWalk™ a été conçu à l'origine pour les rongeurs, nous ne pouvons donc pas exclure que la récupération fonctionnelle assez importante de l'activité motrice globale observée après une hémisection médullaire latérale puisse partiellement résulter d'un biais introduit par l'analyse des paramètres de CatWalk™ en raison des différences naturelles dans la séquence de marche entre les primates et les murins (Shapiro et al. 2014). Cependant, cette récupération assez importante est en accord avec une étude récente démontrant que les primates présentent une meilleure récupération fonctionnelle que les rongeurs après une LME latéralisée au niveau cervical (Friedli et al. 2015). Dans notre étude, le test de préhension a permis une discrimination claire entre les membres postérieurs ipsilatéraux et contralatéraux à la lésion jusqu'à 3 mois après le traumatisme. Cependant, pour affiner davantage l'analyse, l'acquisition vidéo du test de préhension pourrait permettre une analyse détaillée des mouvements des orteils.

Conclusion : ces résultats montrent que les tests comportementaux utilisés permettent l'évaluation précise des altérations de la fonction motrice du membre postérieur ipsilatéral jusqu'à 2 semaines après la lésion. Cependant, seul le « grip test » établit une distinction claire entre les membres postérieurs du côté ipsilatéral à la lésion et ceux du côté contralatéral pendant toute la période expérimentale et ce, jusqu'à 3 mois. Nous avons donc développé un modèle reproductible d'hémisection latérale de la moelle épinière chez *Microcebus murinus* et conçu une combinaison de tests comportementaux qui permettent un suivi précis de la fonction motrice après lésion médullaire.

3.10.3 IRM *in vivo* et *ex vivo* pondérée en T2

a) IRM *in vivo*

Nous avons également analysé l'évolution de la lésion pendant 3 mois en IRM *in vivo* pondérée en T2. Les images ont été obtenues pour chaque animal à 48 h, 1 et 4 semaines et 3 mois après la lésion (Fig. 169). Nous avons identifié des modifications tissulaires au site lésionnel au cours du temps. Plus précisément, 48 h après la lésion, un hyposignal a été identifié du côté lésé de la moelle épinière (Fig. 169A). Cet hyposignal diminue progressivement mais reste visible à 1 (Fig. 169B) et 4 semaines (Fig. 169C) après la lésion médullaire.

Pour quantifier l'extension de la lésion au cours des 3 mois post-lésionnels, nous avons analysé un segment médullaire de 1.6 cm centré sur l'épicentre de la lésion. La segmentation des lésions a été réalisée en mesurant les substances blanche et grise épargnées et lésées.

Le pourcentage de lésion à l'épicentre était de $46 \pm 2.6\%$; $47 \pm 3.2\%$; $42 \pm 3.5\%$, et $43 \pm 6.2\%$ à 48 h, 1 et 4 semaines et 3 mois après la chirurgie, respectivement (Fig. 170). Les évaluations quantitatives n'ont néanmoins montré aucune différence significative dans l'évolution du pourcentage lésionnel à l'épicentre, ni dans le volume lésionnel ou l'extension lésionnelle.

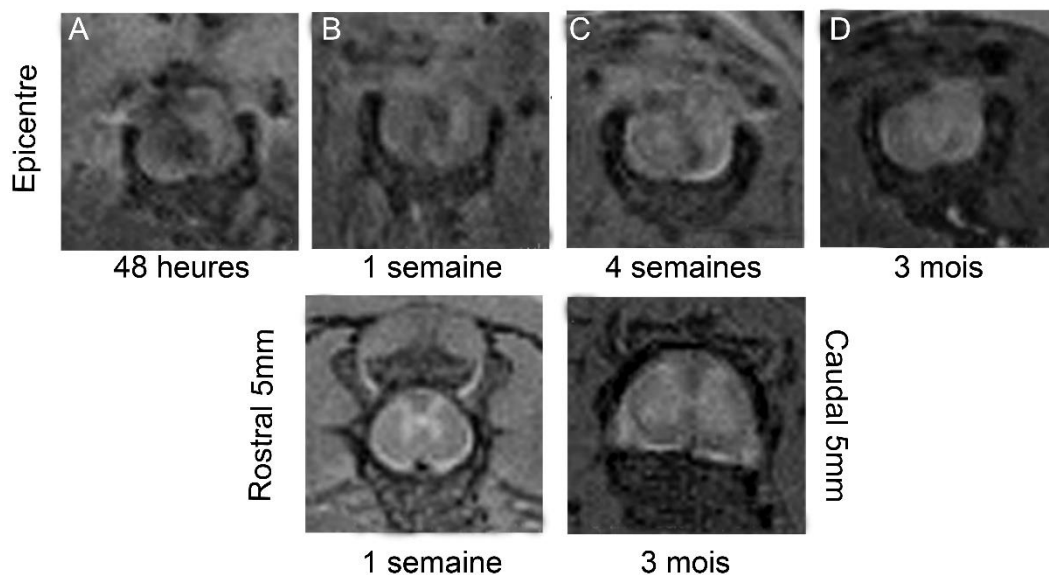


Figure 169 : Suivi longitudinal des microcèbes lésés de 48 heures à 3 mois après LME en IRM *in vivo* pondérée en T2.

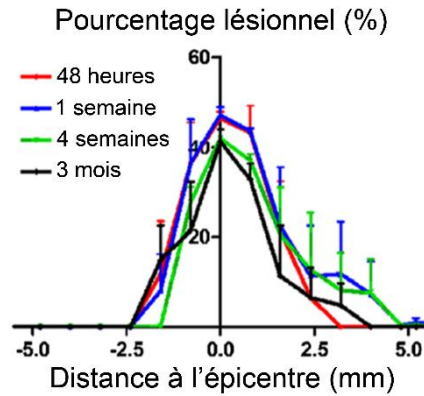


Figure 170 : Quantification du pourcentage lésionnel de 48 heures à 3 mois après LME.

b) IRM *ex vivo*

Nous avons ensuite réalisé une analyse en IRM *ex vivo* pondérée en T2. Pour cela, 3 mois après la chirurgie, et après le dernier passage en IRM *in vivo*, les moelles épinières ont été disséquées pour être imagées et analysées. Au niveau de l'épicentre de la lésion, le côté lésé est apparu avec un hypersignal recouvrant la moitié de la moelle épinière (Fig. 171B). La lésion s'étend uniformément sur une distance de $1,6 \pm 0,9$ mm des deux côtés de l'épicentre, le long de l'axe rostro-caudal. Le pourcentage de lésion à l'épicentre était de $35,9 \pm 6,7\%$ (Fig. 171D).

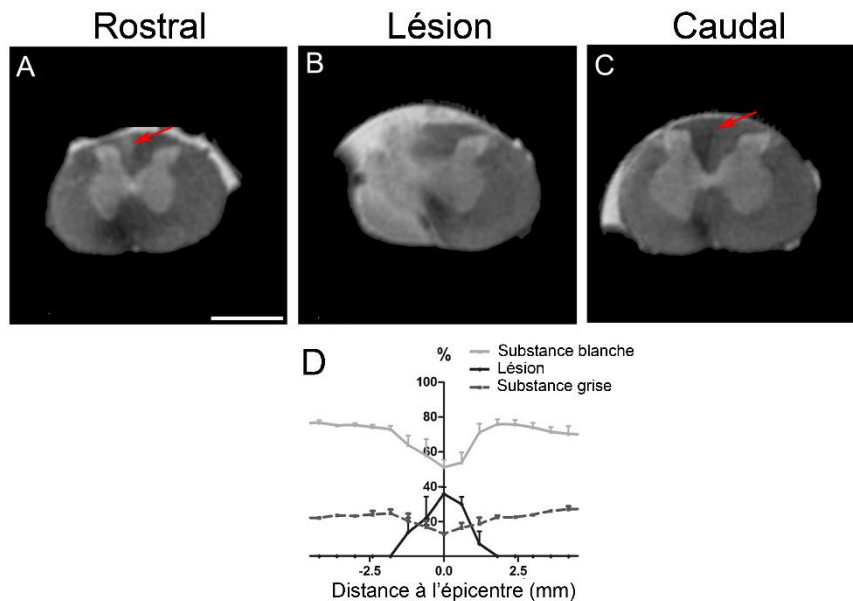


Figure 171 : Analyse des moelles épinières de microcèbe en IRM *ex vivo* pondérée en T2. 60 coupes transversales de 0.6 mm d'épaisseur permettent d'effectuer l'analyse rostralement à la lésion (A), dans la lésion (B) et caudalement à la lésion (C) et de quantifier le pourcentage lésionnel 3 mois après la lésion (D). Les flèches rouges montrent l'hypersignal (A) et l'hyposignal (C) détectables en IRM *ex vivo*. Echelle (A-C) : 1mm.

Trois mois après la chirurgie, le pourcentage de tissu lésé a été quantifié à 42.8% en IRM *in vivo* et 35.9% en IRM *ex vivo*.

c) Bleu de toluidine

L'analyse quantitative histologique avec le marquage au bleu de toluidine montre un pourcentage lésionnel similaire, à environ 35% de lésion (Fig. 172).

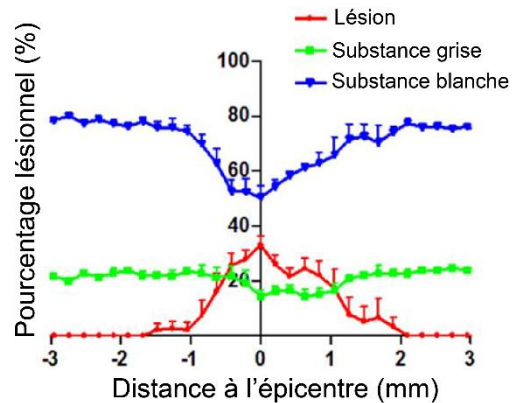


Figure 172 : Quantification du pourcentage lésionnel en utilisant le marquage au bleu de toluidine sur les moelles épinières de microcèbe, 3 mois après la lésion.

Comme dans les études précédentes, il n'y a pas de différence significative dans l'évaluation des tissus endommagés en utilisant les 3 modalités d'analyse (*in vivo*, *ex vivo* et histologie), ce qui permet de valider à nouveau l'utilisation de l'IRM *ex vivo* comme alternative à l'histologie classique.

Conclusion : ces résultats montrent que le suivi longitudinal en IRM *in vivo*, l'IRM *ex vivo* et l'histologie permettent une évaluation quantitative de l'évolution de la lésion au cours du temps chez *Microcebus murinus* après une hémisection latérale de la moelle épinière.

3.10.4 Réactivité gliale après une hémisection latérale de la moelle épinière chez *Microcebus murinus*

La réactivité gliale après un TME a été évaluée en utilisant les marquages IBA1 et GFAP sur des coupes de moelle épinière de *Microcebus murinus* 3 mois après la lésion. Nous avons observé une augmentation de l'expression d'IBA1 proche de l'épicentre de la lésion par rapport aux segments rostraux et caudaux (Fig. 173A-I). Nous avons également trouvé une réactivité importante des microglies/macrophages dans le funiculus dorsal en amont de la lésion (Fig. 173A-C). Morphologiquement, on retrouve deux catégories de microglies/macrophages exprimant IBA1 chez le microcèbe, des microglies non activées présentant des corps cellulaires de petite taille avec des ramifications fines (Fig. 173C-I.) et des microglies activées étant hypertrophiées avec des corps cellulaires élargis et des processus courts et épais (Fig. 173F). Les microglies/macrophages réactifs sont prédominants non seulement au niveau du site lésionnel, mais également dans le funiculus dorsal ipsilatéral au niveau rostral par rapport à la lésion (pointes de flèches en Fig. 173C&F). Les microglies ramifiées non-activées sont plutôt visibles au niveau caudal par rapport à la lésion (flèches dans Fig. 173I). L'analyse quantitative dans la substance grise et le funiculus dorsal confirme une augmentation significative de l'expression d'IBA 1 en amont lésion par rapport aux régions caudales (Fig. 173J&L). L'expression d'IBA1 est également augmentée dans la substance blanche proche de la lésion, il n'y a cependant aucune différence entre les segments rostraux et caudaux (Fig. 173K).

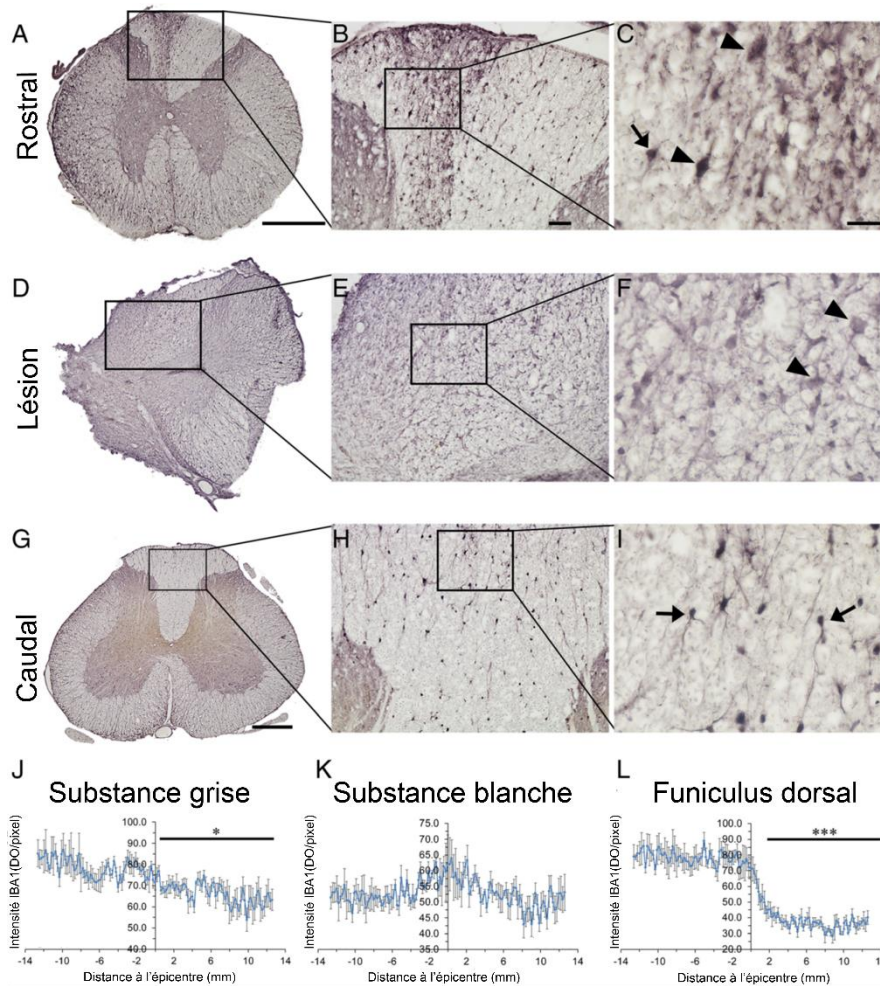


Figure 173 : Photographies en fond clair montrant le marquage des microglies par IBA1 dans les parties rostrales à la lésion (A-C), dans la lésion (D-F) et dans les parties caudales à la lésion (G-I) de la moelle de microcèbe 3 mois après l'hémisection latérale. Quantification par densité optique de l'expression de IBA1 dans la substance grise (J), la substance blanche (K) et le funiculus dorsal (L) le long de l'axe rostro-caudal centré autour de la lésion.

Comme pour le marquage IBA1, une augmentation prononcée de l'expression de la GFAP est observée au niveau de l'épicentre de la lésion par rapport aux régions rostrales et caudales à la lésion (Fig. 174J&K). Les astrocytes proches de la lésion présentent une morphologie allongée avec de nombreuses ramifications qui se chevauchent (Fig. 174E&F).

L'analyse quantitative a confirmé l'augmentation de l'expression de la GFAP adjacente au site de la lésion. Cependant, nous avons observé une augmentation significative de GFAP seulement dans la substance grise au niveau caudal par rapport à la lésion (Fig. 174J).

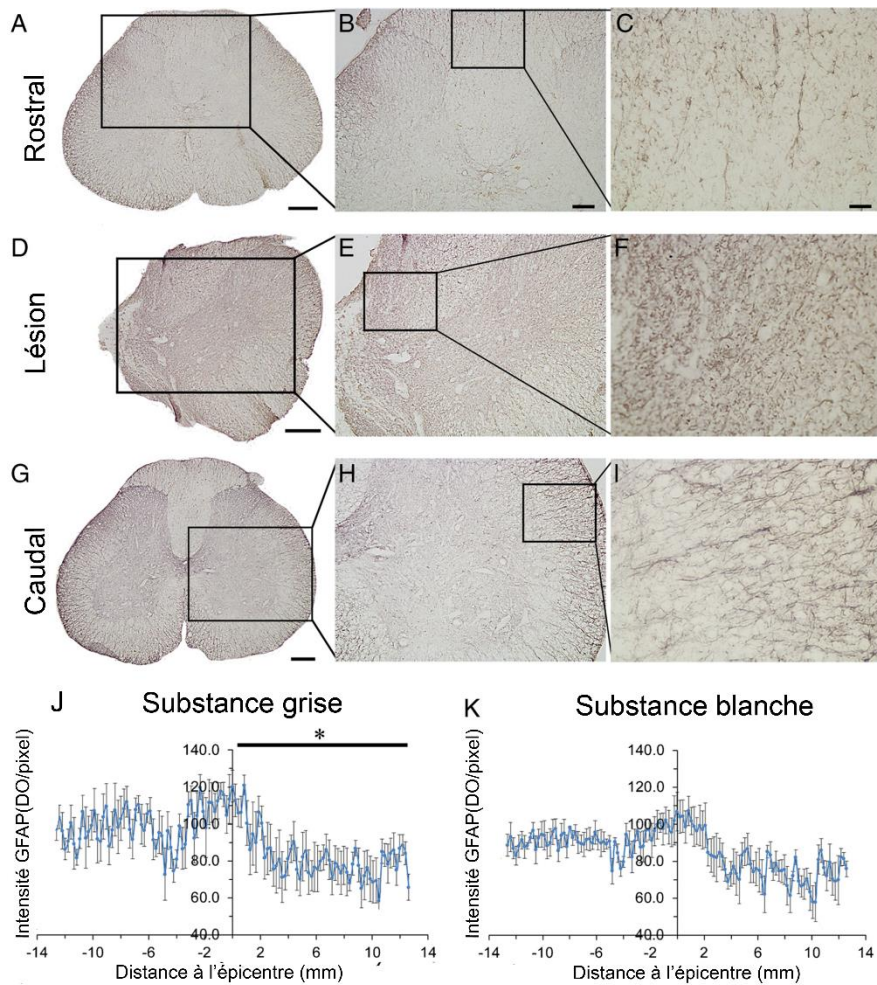


Figure 174 : Photographies en fond clair montrant le marquage des microglies par GFAP dans les parties rostrales à la lésion (A-C), dans la lésion (D-F) et dans les parties caudales à la lésion (G-I) de la moelle de microcèbe 3 mois après l'hémisection latérale. Quantification par densité optique de l'expression de GFAP dans la substance grise (J) et la substance blanche (K) le long de l'axe rostro-caudal centré autour de la lésion.

Etant donné la réactivité marquée des microglies dans le funiculus dorsal (Fig. 174A-C), nous avons procédé à une analyse plus approfondie des intensités du signal en IRM pour comparer les signaux IRM avec la présence de microglies/macrophages. L'analyse de l'intensité du signal en utilisant des IRM *ex vivo* et *in vivo* à 3 mois après la lésion montre qu'une augmentation prononcée de la réactivité des microglies/macrophages coïncide avec un hypersignal (Fig. 174) observé dans la zone du funiculus dorsal située du même côté que la lésion au niveau rostral par rapport à la lésion. L'identification de cet hypersignal pourrait représenter un marqueur en IRM de l'activation de la microglie à distance de l'épicentre de la lésion. En effet, la rupture de la barrière hémato-médullaire ainsi que l'augmentation de la concentration en eau due à la perméabilité des vaisseaux sanguins, s'accompagnent généralement d'une activation microgliale et d'une infiltration périphérique de monocytes. Une étude chez les rongeurs a

également établi une corrélation étroite entre la microglie et les macrophages à l'épicentre et le signal IRM, suggérant que les signaux IRM pondérés en T2 sont utiles pour localiser la cicatrisation gliale et l'inflammation dans la moelle épinière lésée (Byrnes, Fricke, and Faden 2010). Chez la souris, une plus grande activation de la microglie est également observée au niveau rostral par rapport à la lésion dans l'ensemble du funiculus dorsal. Cependant, l'activation spécifique rostrale et ipsilatérale à la lésion des microglies dans le funiculus dorsal pourrait également refléter des spécificités anatomiques plus complexes et une réorganisation de la colonne dorsale des primates induite par la lésion (Rustioni, Hayes, and O'Neill 1979).

En conclusion générale, l'organisation neuro-anatomique et la distribution des cellules gliales de *Microcebus murinus* et de la moelle épinière humaine présentent de fortes similitudes, ce qui confirme l'avantage d'utiliser des primates non-humains comme modèle de lésion médullaire. L'hémisection latérale au niveau lombaire supérieur de la moelle épinière chez le microcèbe provoque des altérations ipsilatérales à la lésion de la fonction motrice au niveau des membres inférieurs. Ces altérations peuvent être évaluées quantitativement à plusieurs temps post-lésionnels. La petite taille de *Microcebus murinus* et sa résistance aux anesthésies répétées permettent le suivi longitudinal de l'évolution de la lésion en IRM *in vivo*. Les microglies activées observées ipsilatéralement et au niveau rostral par rapport à l'épicentre de la lésion dans le funiculus dorsal coïncident avec les signaux IRM. Les critères « idéaux » pour les modèles de lésion médullaire chez le primate non-humain sont de présenter des caractéristiques anatomiques similaires, de reproduire au mieux la pathologie clinique, d'être reproductible et enfin être disponible (Nardone et al. 2017). Sachant qu'un tel modèle animal n'existe pas, le développement de nouveaux modèles animaux contribuera et complètera certainement la compréhension de la pathophysiologie médullaire (Peter, Crocini, and Leinwand 2017). De plus, ces différents modèles, comprenant le *Microcebus murinus* pourront être utilisés dans la mise en place de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Conclusion : ces données révèlent qu'à 3 mois après la lésion chez *Microcebus murinus*, la réactivité gliale augmente en regard du site lésionnel par rapport aux segments plus distaux. Une augmentation significative de la réactivité des astrocytes et des microglies/macrophages est observée dans la substance grise uniquement au-dessus de la lésion. Dans le funiculus dorsal, la zone située du même côté que la lésion présente une augmentation marquée de la réactivité microgliale/macrophagique en amont de la lésion par rapport au segment caudal.

CONCLUSION GENERALE

Les souris Aldh111, qui ont un fond génétique Swiss Webster, et les souris CX3CR1, qui ont un fond génétique C57Bl/6, présentent une récupération fonctionnelle différente. En effet, les souris CX3CR1 montrent un comportement moins anxieux, un meilleur support des pattes arrière et une meilleure coordination entre les pattes. Notre étude vise donc à corrélérer ces différences de récupération fonctionnelle avec des signaux IRM. La fiabilité de l'IRM *in vivo* et *ex vivo* pondérée en T2 pour mesurer la surface et le volume de la lésion a été validée, puisqu'une corrélation forte avec des techniques histologiques classiques a été démontrée. L'IRM pondérée en T2 n'a néanmoins pas permis de distinguer une différence de signal entre les souris CX3CR1 et Aldh111. Au contraire, les IRM *in* et *ex vivo* pondérées en diffusion permettent d'identifier une différence significative dans l'évolution de la lésion entre les deux souches de souris. Par ailleurs, les techniques d'IRM pondérées en diffusion ont aussi été validées par des techniques d'histologie classique avec lesquelles la corrélation est quasiment parfaite. Grâce à l'IRM de diffusion, les ADC parallèles aux axones ont permis d'identifier une réorganisation tissulaire différente entre les deux souches de souris, avec un ADC parallèle aux axones à trois mois post lésionnel équivalent à un contexte non lésé pour les souris CX3CR1 uniquement. Ceci pouvant être le marqueur d'une intégrité axonale supérieure dans la substance blanche des CX3CR1, rostral à la lésion. Ces résultats confirment également que l'analyse IRM longitudinale *in vivo* peut être utilisée de manière fiable pour surveiller l'évolution des lésions après des interventions thérapeutiques dans des modèles murins de lésion de la moelle épinière. De plus, les marquages immunohistochimiques ont permis de révéler une réactivité gliale réduite et une meilleure innervation sérotoninergique chez les souris CX3CR1 par rapport aux souris Aldh111, ce qui pourrait favoriser leur meilleure récupération fonctionnelle.

L'IRM *in vivo* et *ex vivo* pondérée en diffusion ayant été validée grâce à cette première étude, nous avons décidé d'utiliser cet outil pour évaluer un traitement au GW2580, qui inhibe spécifiquement la prolifération des microglies pendant la durée du traitement. Nous avons donc confirmé que le GW2580 bloque bien la prolifération des microglies, avec jusqu'à 60% de microglies proliférantes en moins au niveau de la lésion. Le nombre de microglies et de cellules proliférantes n'est par contre pas impacté par le traitement. Ensuite, l'analyse comportementale permet de confirmer que le traitement induit une amélioration de la fonction locomotrice sans avoir aucun effet sur le comportement anxieux des animaux. Le traitement au GW2580 induirait notamment des mécanismes compensatoires qui permettraient une meilleure récupération fine

après une LME. Les analyses IRM *in vivo* et *ex vivo*, ainsi que les techniques d'histologie classique, démontrent que le traitement au GW2580 n'a pas modifié l'extension et le volume de la lésion sur l'axe rostro-caudal sur une période de 6 semaines après la LME. L'IRM *ex vivo* pondérée en diffusion a néanmoins permis d'observer un effet du traitement au GW2580 sur la diffusivité axiale des souris traitées 6 semaines après la lésion, ce qui pourrait être un marqueur d'intégrité axonale supérieure, même si les valeurs n'atteignent pas les valeurs d'un contexte sain. Enfin, l'inhibition de la prolifération des microglies diminue la réactivité microgliale et astrocytaire après la lésion médullaire. A nouveau, on retrouve une association entre réactivité gliale réduite, diffusivité axiale augmentée et une récupération fonctionnelle après LME.

La nécessité de développer des modèles animaux présentant des propriétés neuroanatomiques plus proche de l'Homme est évidente, c'est pourquoi nous avons choisi d'évaluer le *Microcebus murinus*, petit primate non-humain, comme modèle de lésion de la moelle épinière. Nous avons observé que la moelle épinière de microcèbe présente un ratio substance blanche/grise et une morphologie de cellules gliales se rapprochant plus de l'Homme que les rongeurs. Ensuite, nous avons montré que les tests comportementaux utilisés permettent l'évaluation précise des altérations de la fonction motrice, et que le microcèbe est un bon modèle d'étude des effets induits par une hémisection latérale de la moelle épinière de LME après une hémisection latérale de la moelle épinière. Le suivi longitudinal en IRM *in vivo*, l'IRM *ex vivo* et l'histologie permettent une évaluation quantitative équivalente de la lésion au cours du temps chez *Microcebus murinus*, ce qui prouve que l'on peut utiliser l'IRM à la fois pour les rongeurs et les primates non-humains en étant reproductible. Enfin, nous avons observé une augmentation de la réactivité gliale au niveau du site lésionnel par rapport aux segments distaux de la moelle épinière. De manière intéressante, nous avons corrélé un hypersignal IBA1 à un hypersignal en IRM dans la partie rostrale à la lésion, suggérant fortement que des liens entre les modifications cellulaires et les images IRM peuvent parfois être faits.

Annexe 1 – Ouverture à la clinique

Etant au contact quotidien avec les cliniciens du laboratoire, nous avons choisi de présenter dans cette annexe les procédures IRM appliquées en routine à l'hôpital pour les patients lésés médullaires.

L'imagerie de la colonne vertébrale est une partie essentielle de la prise en charge précoce du patient lésé médullaire. La plupart des centres de traumatologie disposent d'une variété de modalités d'imagerie disponibles pour les traumatismes spinaux aigus. Le choix de la modalité est déterminé par la nécessité d'évaluer les éléments osseux, ligamentaires des tissus mous (disques intervertébraux) et neuraux.

Les protocoles de traumatologie actuels s'appuient fortement sur la tomographie (CT), car elle permet une évaluation efficace de la tête, du corps et de la colonne vertébrale et permet d'identifier la plupart des blessures.

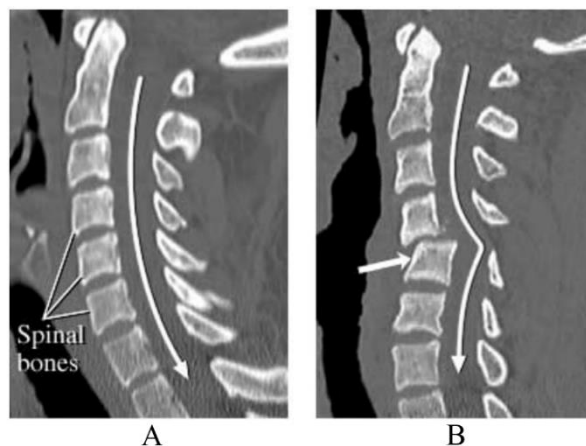


Figure 175 : Le CT scan de gauche (A) montre la position normale des os de la colonne vertébrale tandis que l'image de droite (B) révèle une importante luxation qui a endommagée la moelle épinière (non-visible sur l'image). Intermountain Medical Imaging, Boise, Idaho.

L'IRM est de plus en plus utilisée, ce qui n'a pas toujours été le cas, pour l'évaluation initiale du patient traumatisé. Elle est utilisée de manière quasi systématique dans les grands centres de traumatisme médullaire. L'IRM est habituellement réalisée après des évaluations cliniques et radiologiques (tomodensitométrie ou rayons X), lorsqu'une délimitation plus poussée des structures neurales, comme la moelle épinière et les racines nerveuses est nécessaire en raison de la présence d'un déficit neurologique ou de suspicion d'un problème structurel comme une blessure ligamentaire.

a) L'IRM conventionnelle

L'IRM conventionnelle, c'est à dire l'imagerie pondérée en T1 et T2, fournit d'excellentes images sur les tissus mous et permet une identification facile des caractéristiques de la compression de la moelle épinière, le plus souvent due à une compression osseuse par un recul de la partie postérieure de la vertèbre. Bien que le CT scan soit souvent capable de détecter un œdème ou un hématome des tissus mous pré- et para vertébraux, l'IRM permet une détection plus fiable des lésions traumatiques. Le choix des séquences utilisées en IRM dépend donc de l'évaluation du clinicien et des éléments qu'il veut pouvoir observer afin d'établir son diagnostic. Le tableau suivant résume les séquences utilisées et leur utilité dans le cadre du diagnostic.

Séquence	Effet	Objectif
Short Tau Inversion-récupération (STIR)	Suppression de la graisse	Permet de visualiser les lésions ligamentaires
Pondération T2	Hyper signal sur œdème Hypo signal, hétérogène sur hémorragie	Permet d'identifier les œdèmes et hémorragies intramédullaires
Echo de gradient – pondération susceptibilité	Sensible aux hémorragies	Permet d'identifier les hémorragies et microhémorragies présentes avec une contusion
Pondération T1	Hyper signal de la graisse	Les images T1 peuvent être considérées comme une carte de l'énergie des protons dans les tissus adipeux du corps

Tableau 32 : Séquences usuellement utilisées en IRM clinique.

L'image doit permettre :

- Une évaluation de l'espace entre les fragments osseux et la moelle épinière lors d'une compression.
- Une visualisation des changements primaires et secondaires de la moelle épinière dans les phases aiguës et post-aiguës.

Les lésions de la moelle épinière entraînent des hémorragies et/ou un œdème, et lorsqu'ils sont identifiés sont des éléments qui peuvent être de bon indicateurs de la sévérité de la lésion.

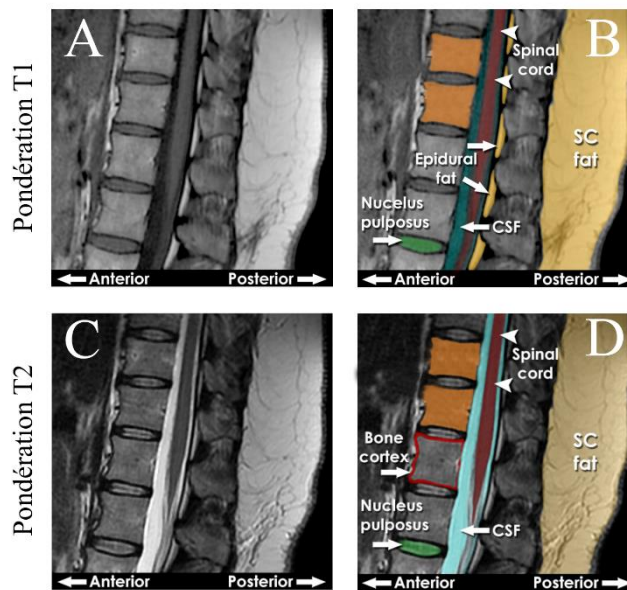


Figure 176 : La pondération T1 (A & B) révèle la graisse sous-cutanée (SC fat) mais aussi les corps vertébraux. Le liquide céphalo rachidien (CSF) apparaît en noir sur les images T1. La pondération T2 (C & D) révèle la graisse et l'eau.

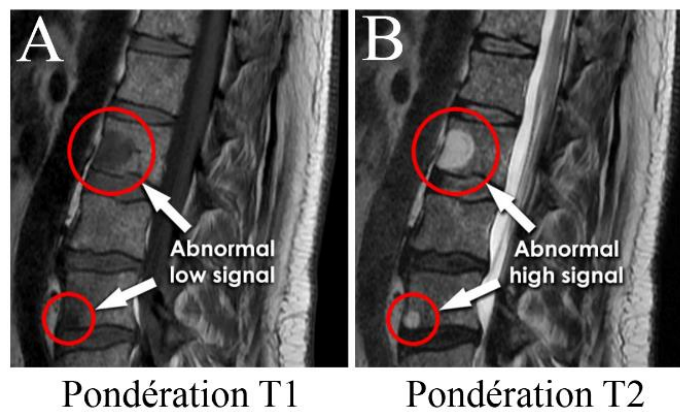


Figure 177 : La pondération T1 (A) révèle un hyposignal dans le corps vertébral, indiquant une déstructuration de tissus osseux sains et une augmentation du contenu en eau. La pondération T2 (B) révèle un signal plus important dans les corps vertébraux.

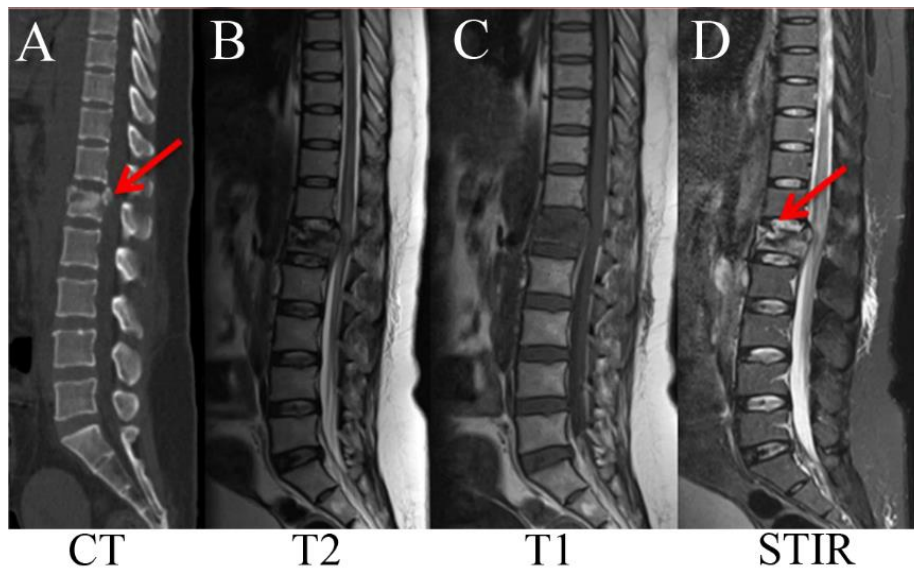


Figure 178 : Le CT scan (A) montre une fracture du corps vertébral L1 avec un fragment osseux (flèche rouge) dans le canal rachidien. On parle en clinique d'un recul du mur postérieur. L'IRM pondérée T2 (B) révèle un hyper signal dans la moelle épinière, de T12 à L1.

L'intérêt majeur de la séquence STIR est de rechercher un hyper signal dans l'ensemble des structures ligamentaires postérieures (ligaments jaunes, inter-épineux, inter-lamaire, sus-épineux) qui serait le signe d'une instabilité majeure et changerait la stratégie thérapeutique, imposant une chirurgie de stabilisation (plus ou moins associée à une décompression si nécessaire). A un moindre degré, le STIR permet de montrer s'il y a une atteinte discale majeure participant à l'instabilité.

L'utilisation de l'IRM pour l'évaluation initiale des patients traumatisés médullaires est pondérée par le fait que les temps d'acquisitions sont parfois longs selon l'état du patient. Le premier facteur limitant de l'utilisation de l'IRM en évaluation initiale est malheureusement la disponibilité de l'appareil au moment de l'arrivée du patient. Il est utile d'effectuer un suivi sur des temps post-lésionnels plus lointains, mais il n'est pas possible de garder un patient en position décubitus dorsal strict alors qu'il vient de subir son traumatisme. Le risque de provoquer des douleurs trop importantes, voire des perturbations hémodynamiques est important dans les cas de graves polytraumatismes. Certains patients dans un état encore plus grave peuvent également présenter des lésions crânio-encéphaliques et thoraciques pouvant entraîner une augmentation de la pression intracrânienne et une diminution de la ventilation pendant la durée de l'acquisition de l'IRM. On préférera donc une modalité permettant l'acquisition rapide d'une image amenant au premier diagnostic. En effet, la procédure classique en cas de polytraumatismes graves est d'abord un scanner de corps entier (crâne,

thorax, abdomen et pelvis) avec injection de produit de contraste, puis si une lésion médullaire est suspectée et que le patient est stable, on effectue une IRM médullaire pré-chirurgicale. Si on préfère utiliser l'IRM, il est possible de réduire les temps d'acquisition en utilisant des séquences spécifiques avec des antennes spécifiques. Il n'y a néanmoins à ce jour que très peu de données sur ces séquences rapides (Ryken et al. 2013).

Actuellement, le fait d'effectuer une IRM n'a néanmoins pas une influence prouvée sur la manière dont le clinicien va effectuer son approche chirurgicale si elle est nécessaire. Même s'il n'existe pas de preuve dans la littérature, lorsque l'on interroge les neurochirurgiens du CHU de Montpellier (Dr. Gaetan Poulen, communication personnelle), dans le cas de fractures non déplacées, non neurologiques, qui ne nécessitent pas une chirurgie de décompression urgente, le résultat de la séquence STIR permettrait d'orienter les décisions chirurgicales notamment lorsque l'impact se situe au niveau cervical. Si aucune lésion disco-ligamentaire n'est observée en STIR, une immobilisation dans un collier rigide est effectuée. Si au contraire une lésion disco-ligamentaire est observée, une chirurgie de stabilisation est effectuée. En l'absence de compression médullaire, cette chirurgie peut d'ailleurs être décalée de plusieurs jours.

Il existe très peu d'études dans la littérature s'intéressant à la prise de décision effectuée par le clinicien grâce à l'IRM. Le diagnostic effectué par le clinicien (hémorragie localisée, œdème, canal spinal étroit) a très certainement une influence sur la prise de décision mais cette influence n'est pas prouvée dans la littérature. Une seule étude avance que l'IRM d'évaluation initiale a fourni un outil essentiel pour le diagnostic précis de la compression de la moelle épinière et a directement influencé la prise en charge clinique initiale chez la majorité des patients de leur protocole (Papadopoulos et al. 2002).

Il est néanmoins reconnu que certains diagnostics pourraient donner un indice de la future récupération des patients traumatisés médullaire. La diffusion de l'hémorragie intramédullaire ainsi que le diamètre du canal spinal seraient par exemple de bons indicateurs. Dans la littérature, de nombreuses caractéristiques de l'IRM sont utilisées puis interprétées de manière inhomogène. En effet, une des principales limitations vient de la définition variable de ce qui constitue la « lésion », l'hémorragie et l'œdème. Par exemple, plusieurs études ont classé un signal anormal pondéré en T2 comme une « lésion », tandis qu'une autre étude combinait l'œdème et l'hémorragie pour définir la lésion (Owens et al. 2008).

De plus, l'IRM conventionnelle peut n'avoir qu'une utilité de diagnostic limitée en raison de son incapacité à distinguer les lésions résorbables des lésions tissulaires irréversibles. Par exemple, l'œdème seul, qu'il soit limité ou étendu, est résorbable. D'autre part, la contusion, qui peut avoir un signal IRM indiscernable de l'œdème sur les images pondérées en T2, signifie une perte permanente des neurones. Les limites actuelles de l'IRM conventionnelle confirment la nécessité de développer des techniques d'IRM avancées qui peuvent fournir une vue plus détaillée de la lésion de la moelle épinière, comme le tenseur de diffusion, la pondération susceptibilité, l'IRM fonctionnelle, la spectroscopie MR, l'imagerie de perfusion, et d'autres séquences sensibles à la démyélinisation, comme le transfert d'aimantation et la fraction d'eau de myéline.

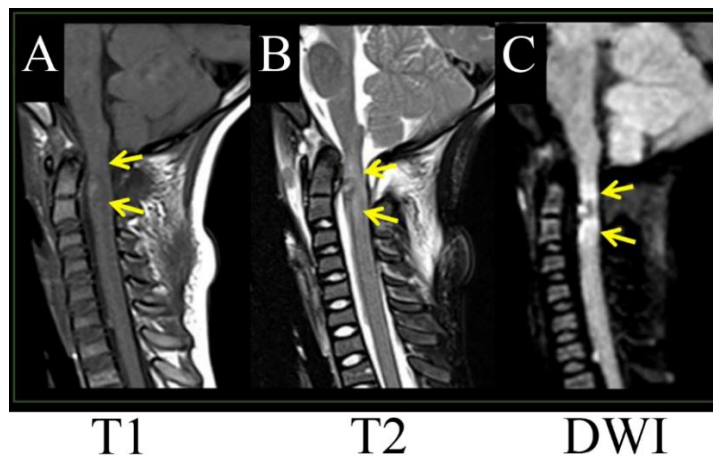


Figure 179 : L'IRM pondérée T1 (A) et l'IRM pondérée T2 (B) ne permettent pas une révélation claire de l'œdème alors que l'on voit clairement un hyper signal dû à une restriction de la diffusion dans l'œdème en utilisant l'IRM pondérée diffusion (C) (R. Tade, Optimizing pediatric spine MRI protocols : tips, tricks and rationales).

b) L'IRM de diffusion

Connaissant les limites des techniques d'IRM classiques dans l'estimation de l'étendue de la lésion de la moelle épinière, il est nécessaire d'évaluer de nouvelles techniques. L'IRM de diffusion a d'abord été évaluée sur les animaux, ce qui a donné des résultats prometteurs (Basser and Jones 2002; Loher et al. 2003; Song et al. 2003). Cette technique est très largement utilisée lorsqu'il s'agit d'imager le cerveau, mais est plus difficile à mettre en place pour imager la moelle épinière, puisque le volume de tissu à imager est bien plus faible. Le flux de LCR provoque aussi des artefacts et la moelle épinière a des propriétés naturellement anisotropique. De plus, le fait que l'imagerie de diffusion ne soit pas pratiquée en routine entraîne un manque de standardisation des protocoles pour imager le tenseur de diffusion dans la moelle épinière.

Comme pour l'IRM conventionnelle, les preuves d'un lien direct entre le diagnostic effectué avec l'IRM de diffusion et une possible récupération neurologique sont faibles. Il existe toutefois quelques cas où une restriction de la diffusion dans la moelle épinière corrèle avec une mauvaise récupération neurologique (Nedeltchev et al. 2004). Dans la moelle épinière, une ischémie est caractérisée dans certains cas par un signal T2 élevé et un élargissement de la moelle épinière. Dans de précédentes études, une cohorte de patients présentant une lésion médullaire incomplète n'a montré aucune anomalie en utilisant des séquences d'IRM conventionnelles MR classiques, cependant l'imagerie pondérée en diffusion a démontré une réduction de la valeur du coefficient de diffusion apparent dans le plan transversal indiquant une diffusion restreinte (Loher et al. 2003; Fujikawa et al. 2004; Thurnher and Bammer 2006).

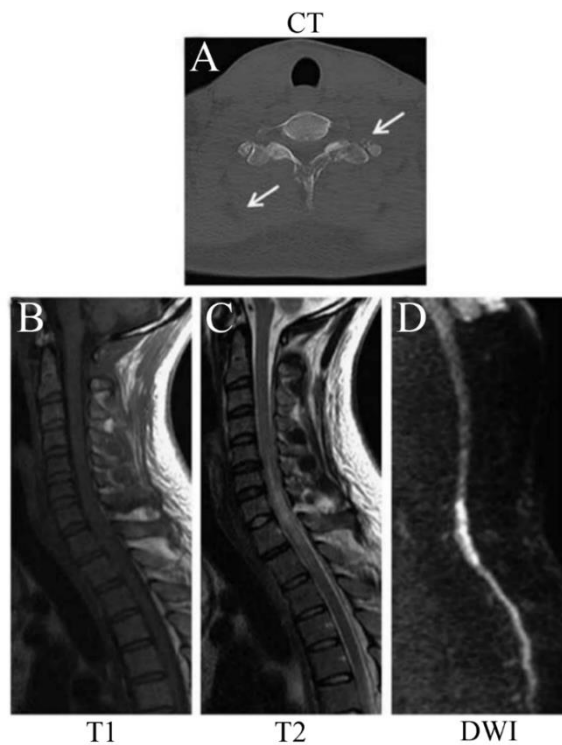


Figure 180 : Le patient a reçu une balle dans la colonne vertébrale mais sa trajectoire n'a pas atteint la moelle épinière. Le CT scan (A) montre la trajectoire de la balle et l'extension de la fracture (flèches blanches). L'IRM pondérées T1 (B) ne permet pas de révéler un impact sur la moelle épinière tandis que l'IRM pondérée T2 (C) affiche un hyper signal mais ne montre pas de déchirure de la moelle, ce qui indique que la lésion est secondaire et due à la proximité de la force de souffle de la balle plutôt qu'une lacération directe. L'imagerie pondérée diffusion (D) (b-value=1000) révèle un hyper signal ce qui indique une zone de diffusion restreinte qui correspond à une lésion axonale.

Même si certaines mesures quantitatives dérivées du tenseur de diffusion semblent corrélérer avec des caractéristiques micro structurelles importantes telles que l'intégrité axonale, une approche standardisée du tenseur est nécessaire avant d'imaginer une mise en place routinière du

protocole (Kurpad et al. 2017). Le tenseur semble être un outil puissant pouvant interpréter de façon cohérente les changements de diffusion dans la zone de la lésion ainsi qu'à distance dans la moelle épinière, et pourrait fournir de puissantes informations prédictives. L'imagerie pondérée diffusion reste à ce jour une technique sensible et parfois difficile à mettre en place, mais elle est maintenant disponible sur la plupart des systèmes. Au fur et à mesure que le matériel et les logiciels se développent, ce type d'imagerie est susceptible de devenir un outil clinique plus utile dans le contexte d'une lésion de la moelle épinière, à condition d'optimiser le temps d'acquisition de ces protocoles complémentaires.

Annexe 2 – Equations de Bloch

Le comportement de l'aimantation macroscopique de la population de spin en présence d'un champ magnétique excitateur B_{rf} et sous l'influence des phénomènes de relaxations magnétiques nucléaires est régi par l'équation de Bloch, donnée par l'expression :

$$\dot{M} = \gamma M \wedge B^{eff} - R (M - M_0)$$

R est la matrice de relaxation qui s'écrit :

$$R = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ \frac{1}{T2} & 1 & 0 \\ 0 & \frac{1}{T2} & 1 \\ 0 & 0 & \frac{1}{T1} \end{pmatrix}$$

$B^{eff} = B_0 + B_{rf}$ et pour un champ excitateur linéairement polarisé, on aura $B_{rf} = 2B_1 \cos(\omega_{rf}t + \phi)$. Nous pouvons désormais exprimer l'aimantation globale M et le champ magnétique effectif dans ce référentiel tournant par l'expression mathématique suivante:

$$\dot{M} = \begin{cases} \dot{M}_x = \gamma(M_y B_z - M_z B_y) - \frac{M_x}{T2} \\ \dot{M}_y = \gamma(M_z B_x - M_x B_z) - \frac{M_y}{T2} \\ \dot{M}_z = \gamma(M_x B_y - M_y B_x) - \frac{(M_x - M_0)}{T1} \end{cases}$$

Les composantes du champ magnétique effectif dans ce référentiel sont données par :

$$\begin{cases} B_x = B_1 \cos(\phi) \\ B_y = B_1 \sin(\phi) \\ B_z = -\frac{\Omega_0}{\gamma} \end{cases}$$

$\Omega_0 = \omega_0 - \omega_{rf}$ étant la précession effective du vecteur aimantation dans le référentiel tournant. Pour un champ magnétique B_{rf} dirigé selon l'axe de référence (ox), sa phase ϕ serait donc nulle et dans ce cas on aura $B_x = B_1$, $B_y = 0$ et $B_z = -\frac{\Omega_0}{\gamma}$.

En portant ces valeurs dans les équations, on aura :

$$\dot{M} = \begin{cases} \dot{M}_x = -M_y\Omega_0 - \frac{M_x}{T_2} \\ \dot{M}_y = M_z\omega_{rf} + M_x\Omega_0 - \frac{M_y}{T_2} \\ \dot{M}_z = -M_y\omega_{rf} - \frac{(M_z - M_0)}{T_1} \end{cases}$$

Les équations précédentes traduisent une double précession, l'une autour de B_0 à la vitesse angulaire Ω_0 et l'autre autour de B_{rf} à la vitesse angulaire ω_{rf} . Les termes en T_2 et T_1 correspondent au retour de l'aimantation à l'équilibre par les mécanismes de relaxation.

Les solutions de ces équations de Bloch sont obtenues en régime permanent comme:

$$M = \begin{cases} M_x = \frac{\Delta\omega\gamma B_1 T_2^2}{1 + (T_2\Delta\omega)^2 + \gamma^2 B_1^2 T_1 T_2} M_0 \\ M_y = \frac{\Delta B_1 T_2}{1 + (T_2\Delta\omega)^2 + \gamma^2 B_1^2 T_1 T_2} M_0 \\ M_z = \frac{1 + (T_2\Delta\omega)^2}{1 + (T_2\Delta\omega)^2 + \gamma^2 B_1^2 T_1 T_2} M_0 \end{cases}$$

Nous remarquons à partir de ces solutions, que toutes les composantes de l'aimantation sont proportionnelles à M_0 , cela traduit le fait qu'en absence de différences de populations entre les niveaux d'énergie magnétique (absence de polarisation initiale), la résonance nucléaire est inobservable. En RMN, le signal détecté est proportionnel aux composantes transversales M_x et M_y de l'aimantation. Le terme $\gamma^2 B_1^2 T_1 T_2$ étant proportionnel à la puissance de la radiofréquence ($P \sim B_1^2$), donc pour les faibles puissances on peut écrire $\gamma^2 B_1^2 T_1 T_2 \ll 1$. Sous cette condition, les composantes transversales peuvent être réécrites, selon :

$$M = \begin{cases} \frac{\Delta\omega\gamma B_1 T_2^2}{1 + (T_2\Delta\omega)^2} M_0 \\ \frac{\gamma B_1 T_2}{1 + (T_2\Delta\omega)^2} M_0 \end{cases}$$

Ainsi, les composantes M_x et M_y sont nommées respectivement, Lorentzienne en dispersion et en absorption.

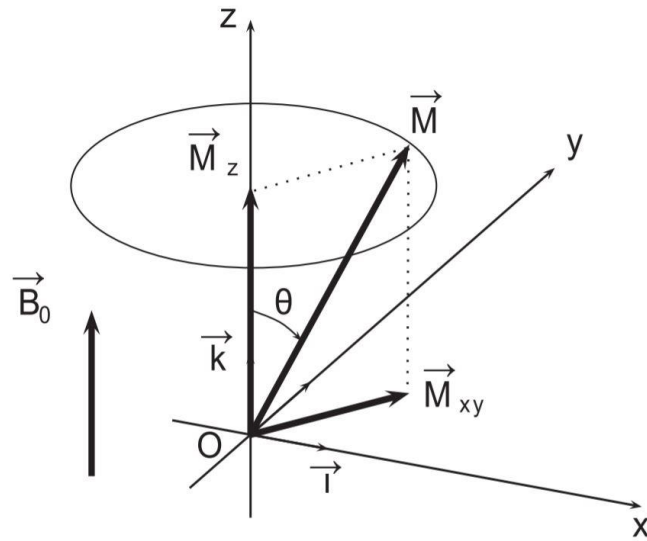


Figure 181 : Composantes longitudinale et transverse de l'aimatation. Modifié à partir de <https://eos.univ-reims.fr/LSD/JmnSoft/livre.pdf>.

$$M = \begin{cases} M_z(t) = M_0 \times (1 - e^{(-\frac{t}{T_1})}) \\ M_x(t) = M_0 \times e^{(-\frac{t}{T_2})} \cos(\omega_0 t) \\ M_y(t) = M_0 \times e^{(-\frac{t}{T_2})} \sin(\omega_0 t) \end{cases}$$

Références

- Anderson, Mark A., Joshua E. Burda, Yilong Ren, Yan Ao, Timothy M. O'Shea, Riki Kawaguchi, Giovanni Coppola, Baljit S. Khakh, Timothy J. Deming, and Michael V. Sofroniew. 2016. "Astrocyte Scar Formation Aids Central Nervous System Axon Regeneration." *Nature* 532 (7598): 195–200. <https://doi.org/10.1038/nature17623>.
- Antri, M., C. Mouffle, D. Orsal, and J.-Y. Barthe. 2003. "5-HT_{1A} Receptors Are Involved in Short- and Long-Term Processes Responsible for 5-HT-Induced Locomotor Function Recovery in Chronic Spinal Rat." *The European Journal of Neuroscience* 18 (7): 1963–72.
- Basser, Peter J., and Derek K. Jones. 2002. "Diffusion-Tensor MRI: Theory, Experimental Design and Data Analysis - a Technical Review." *NMR in Biomedicine* 15 (7–8): 456–67. <https://doi.org/10.1002/nbm.783>.
- Basso, D. Michele, Lesley C. Fisher, Aileen J. Anderson, Lyn B. Jakeman, Dana M. McTigue, and Phillip G. Popovich. 2006. "Basso Mouse Scale for Locomotion Detects Differences in Recovery after Spinal Cord Injury in Five Common Mouse Strains." *Journal of Neurotrauma* 23 (5): 635–59. <https://doi.org/10.1089/neu.2006.23.635>.
- Baumann, N., and D. Pham-Dinh. 2001. "Biology of Oligodendrocyte and Myelin in the Mammalian Central Nervous System." *Physiological Reviews* 81 (2): 871–927. <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.2.871>.
- Behr, V. C., T. Weber, T. Neuberger, M. Vroemen, N. Weidner, U. Bogdahn, A. Haase, P. M. Jakob, and C. Faber. 2004. "High-Resolution MR Imaging of the Rat Spinal Cord in Vivo in a Wide-Bore Magnet at 17.6 Tesla." *Magma (New York, N.Y.)* 17 (3–6): 353–58. <https://doi.org/10.1007/s10334-004-0057-5>.
- Benveniste, H., H. Qui, L. W. Hedlund, F. D'Ercole, and G. A. Johnson. 1998. "Spinal Cord Neural Anatomy in Rats Examined by in Vivo Magnetic Resonance Microscopy." *Regional Anesthesia and Pain Medicine* 23 (6): 589–99.
- Berg, M. E. L. van den, J. M. Castellote, I. Mahillo-Fernandez, and J. de Pedro-Cuesta. 2010. "Incidence of Spinal Cord Injury Worldwide: A Systematic Review." *Neuroepidemiology* 34 (3): 184–192; discussion 192. <https://doi.org/10.1159/000279335>.
- Bilgen, M., R. Abbe, S. J. Liu, and P. A. Narayana. 2000. "Spatial and Temporal Evolution of Hemorrhage in the Hyperacute Phase of Experimental Spinal Cord Injury: In Vivo Magnetic Resonance Imaging." *Magnetic Resonance in Medicine* 43 (4): 594–600.
- Bilgen, Mehmet. 2004. "Simple, Low-Cost Multipurpose RF Coil for MR Microscopy at 9.4 T." *Magnetic Resonance in Medicine* 52 (4): 937–40. <https://doi.org/10.1002/mrm.20228>.
- Bilgen, Mehmet, Baraa Al-Hafez, Tareq Alrefae, Yong-Yu He, Irina V. Smirnova, M. Mustafa Aldur, and Barry W. Festoff. 2007. "Longitudinal Magnetic Resonance Imaging of Spinal Cord Injury in Mouse: Changes in Signal Patterns Associated with the Inflammatory Response." *Magnetic Resonance Imaging* 25 (5): 657–64. <https://doi.org/10.1016/j.mri.2006.10.009>.

- Bilgen, Mehmet, Baraa Al-Hafez, Thomas M. Malone, and Irina V. Smirnova. 2005. "Ex Vivo Magnetic Resonance Imaging of Rat Spinal Cord at 9.4 T." *Magnetic Resonance Imaging* 23 (4): 601–5. <https://doi.org/10.1016/j.mri.2005.02.003>.
- Blight, A. R., and V. Decrescito. 1986. "Morphometric Analysis of Experimental Spinal Cord Injury in the Cat: The Relation of Injury Intensity to Survival of Myelinated Axons." *Neuroscience* 19 (1): 321–41.
- Bonny, Jean-Marie, Manuel Gaviria, Jean-Pierre Donnat, Beatrix Jean, Alain Privat, and Jean-Pierre Renou. 2004. "Nuclear Magnetic Resonance Microimaging of Mouse Spinal Cord in Vivo." *Neurobiology of Disease* 15 (3): 474–82. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2003.11.026>.
- Brambilla, Roberta, Andres Hurtado, Trikaldarshi Persaud, Kim Esham, Damien D. Pearse, Martin Oudega, and John R. Bethea. 2009. "Transgenic Inhibition of Astroglial NF-Kappa B Leads to Increased Axonal Sparing and Sprouting Following Spinal Cord Injury." *Journal of Neurochemistry* 110 (2): 765–78. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06190.x>.
- Bunge, M. B. 1994. "Transplantation of Purified Populations of Schwann Cells into Lesioned Adult Rat Spinal Cord." *Journal of Neurology* 242 (1 Suppl 1): S36-39.
- Byrnes, Kimberly R., Stanley T. Fricke, and Alan I. Faden. 2010. "Neuropathological Differences between Rats and Mice after Spinal Cord Injury." *Journal of Magnetic Resonance Imaging: JMRI* 32 (4): 836–46. <https://doi.org/10.1002/jmri.22323>.
- Cahoy, John D., Ben Emery, Amit Kaushal, Lynette C. Foo, Jennifer L. Zamanian, Karen S. Christopherson, Yi Xing, et al. 2008. "A Transcriptome Database for Astrocytes, Neurons, and Oligodendrocytes: A New Resource for Understanding Brain Development and Function." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 28 (1): 264–78. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4178-07.2008>.
- Callot, Virginie, Guillaume Duhamel, and Patrick J. Cozzone. 2007. "In Vivo Mouse Spinal Cord Imaging Using Echo-Planar Imaging at 11.75 T." *Magma (New York, N.Y.)* 20 (4): 169–73. <https://doi.org/10.1007/s10334-007-0079-x>.
- Callot, Virginie, Guillaume Duhamel, Patrick J. Cozzone, and Frank Kober. 2008. "Short-Scan-Time Multi-Slice Diffusion MRI of the Mouse Cervical Spinal Cord Using Echo Planar Imaging." *NMR in Biomedicine* 21 (8): 868–77. <https://doi.org/10.1002/nbm.1274>.
- Callot, Virginie, Guillaume Duhamel, Yann Le Fur, Patrick Decherchi, Tanguy Marqueste, Frank Kober, and Patrick J. Cozzone. 2010. "Echo Planar Diffusion Tensor Imaging of the Mouse Spinal Cord at Thoracic and Lumbar Levels: A Feasibility Study." *Magnetic Resonance in Medicine* 63 (4): 1125–34. <https://doi.org/10.1002/mrm.22301>.
- Casha, S., W. R. Yu, and M. G. Fehlings. 2001. "Oligodendroglial Apoptosis Occurs along Degenerating Axons and Is Associated with FAS and p75 Expression Following Spinal Cord Injury in the Rat." *Neuroscience* 103 (1): 203–18.
- Celani, M. G., L. Spizzichino, S. Ricci, M. Zampolini, M. Franceschini, and Retrospective Study Group on SCI. 2001. "Spinal Cord Injury in Italy: A Multicenter Retrospective Study." *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation* 82 (5): 589–96. <https://doi.org/10.1053/apmr.2001.21948>.

- Cesaro, P., J. D. Degos, and C. Martin-Mondière. 1984. “[Physiopathology of the clinical manifestation of multiple sclerosis. Electrophysiological hypotheses].” *Revue Neurologique* 140 (1): 20–27.
- Chen, Ying-Ju, Fu-Chou Cheng, Meei-Ling Sheu, Hong-Lin Su, Chun-Jung Chen, Jason Sheehan, and Hung-Chuan Pan. 2014. “Detection of Subtle Neurological Alterations by the Catwalk XT Gait Analysis System.” *Journal of NeuroEngineering and Rehabilitation* 11 (April): 62. <https://doi.org/10.1186/1743-0003-11-62>.
- Christakis, D. A., J. S. B. Ramirez, and J. M. Ramirez. 2012. “Overstimulation of Newborn Mice Leads to Behavioral Differences and Deficits in Cognitive Performance.” *Scientific Reports* 2 (July). <https://doi.org/10.1038/srep00546>.
- Clark, Chris A., and David J. Werring. 2002. “Diffusion Tensor Imaging in Spinal Cord: Methods and Applications - a Review.” *NMR in Biomedicine* 15 (7–8): 578–86. <https://doi.org/10.1002/nbm.788>.
- Coillot, Christophe, Rahima Sidiboulouar, Eric Nativel, Michel Zanca, Eric Alibert, Maida Cardoso, Guillaume Saint-Martin, et al. 2016. “Signal Modeling of an MRI Ribbon Solenoid Coil Dedicated to Spinal Cord Injury Investigations.” *Journal of Sensors and Sensor Systems* 5 (1): 137–45. <https://doi.org/10.5194/jsss-5-137-2016>.
- Conway, James G., Brad McDonald, Janet Parham, Barry Keith, David W. Rusnak, Eva Shaw, Marilyn Jansen, et al. 2005. “Inhibition of Colony-Stimulating-Factor-1 Signaling in Vivo with the Orally Bioavailable cFMS Kinase Inhibitor GW2580.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (44): 16078–83. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502000102>.
- Courtine, Grégoire, Mary Bartlett Bunge, James W. Fawcett, Robert G. Grossman, Jon H. Kaas, Roger Lemon, Irin Maier, et al. 2007. “Can Experiments in Nonhuman Primates Expedite the Translation of Treatments for Spinal Cord Injury in Humans?” *Nature Medicine* 13 (5): 561–66. <https://doi.org/10.1038/nm1595>.
- Curt, Armin, Hubertus J. A. Van Hedel, Daniel Klaus, Volker Dietz, and EM-SCI Study Group. 2008. “Recovery from a Spinal Cord Injury: Significance of Compensation, Neural Plasticity, and Repair.” *Journal of Neurotrauma* 25 (6): 677–85. <https://doi.org/10.1089/neu.2007.0468>.
- D’Amico, Jessica M., Katherine C. Murray, Yaqing Li, K. Ming Chan, Mark G. Finlay, David J. Bennett, and Monica A. Gorassini. 2013. “Constitutively Active 5-HT₂/α₁ Receptors Facilitate Muscle Spasms after Human Spinal Cord Injury.” *Journal of Neurophysiology* 109 (6): 1473–84. <https://doi.org/10.1152/jn.00821.2012>.
- David, S., and A. J. Aguayo. 1981. “Axonal Elongation into Peripheral Nervous System ‘bridges’ after Central Nervous System Injury in Adult Rats.” *Science (New York, N.Y.)* 214 (4523): 931–33.
- David, Samuel, and Antje Kroner. 2011. “Repertoire of Microglial and Macrophage Responses after Spinal Cord Injury.” *Nature Reviews. Neuroscience* 12 (7): 388–99. <https://doi.org/10.1038/nrn3053>.
- David, Samuel, Rubèn López-Vales, and V. Wee Yong. 2012. “Harmful and Beneficial Effects of Inflammation after Spinal Cord Injury: Potential Therapeutic Implications.” *Handbook of Clinical Neurology* 109: 485–502. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52137-8.00030-9>.

- David, Sascha, Chandra C. Ghosh, Philipp Kumpers, Nelli Shushakova, Paul Van Slyke, Eliyahu V. Khankin, S. Ananth Karumanchi, Dan Dumont, and Samir M. Parikh. 2011. "Effects of a Synthetic PEG-Ylated Tie-2 Agonist Peptide on Endotoxemic Lung Injury and Mortality." *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 300 (6): L851-862. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00459.2010>.
- Deo, Aparna A., Raymond J. Grill, Khader M. Hasan, and Ponnada A. Narayana. 2006. "In Vivo Serial Diffusion Tensor Imaging of Experimental Spinal Cord Injury." *Journal of Neuroscience Research* 83 (5): 801–10. <https://doi.org/10.1002/jnr.20783>.
- Desclaux, Mathieu, Florence E. Perrin, Anh Do-Thi, Monica Prieto-Cappellini, Minerva Gimenez Y Ribotta, Jacques Mallet, and Alain Privat. 2015. "Lentiviral-Mediated Silencing of Glial Fibrillary Acidic Protein and Vimentin Promotes Anatomical Plasticity and Functional Recovery after Spinal Cord Injury." *Journal of Neuroscience Research* 93 (1): 43–55. <https://doi.org/10.1002/jnr.23468>.
- Devivo, M. J. 2012. "Epidemiology of Traumatic Spinal Cord Injury: Trends and Future Implications." *Spinal Cord* 50 (5): 365–72. <https://doi.org/10.1038/sc.2011.178>.
- Dixon, Kirsty J., Kathryn M. Munro, Andrew W. Boyd, Perry F. Bartlett, and Ann M. Turnley. 2012. "Partial Change in EphA4 Knockout Mouse Phenotype: Loss of Diminished GFAP Upregulation Following Spinal Cord Injury." *Neuroscience Letters* 525 (1): 66–71. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2012.07.023>.
- Do-Thi, Anh, Florence E. Perrin, Mathieu Desclaux, Paulette Saillour, Lahouari Amar, Alain Privat, and Jacques Mallet. 2016. "Combination of Grafted Schwann Cells and Lentiviral-Mediated Prevention of Glial Scar Formation Improve Recovery of Spinal Cord Injured Rats." *Journal of Chemical Neuroanatomy* 76 (Pt A): 48–60. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2015.12.014>.
- Ellingson, B. M., J. L. Ulmer, S. N. Kurpad, and B. D. Schmit. 2008. "Diffusion Tensor MR Imaging in Chronic Spinal Cord Injury." *AJNR. American Journal of Neuroradiology* 29 (10): 1976–82. <https://doi.org/10.3174/ajnr.A1272>.
- Emery, E., P. Aldana, M. B. Bunge, W. Puckett, A. Srinivasan, R. W. Keane, J. Bethea, and A. D. Levi. 1998. "Apoptosis after Traumatic Human Spinal Cord Injury." *Journal of Neurosurgery* 89 (6): 911–20. <https://doi.org/10.3171/jns.1998.89.6.0911>.
- Faulkner, Jill R., Julia E. Herrmann, Michael J. Woo, Keith E. Tansey, Ngan B. Doan, and Michael V. Sofroniew. 2004. "Reactive Astrocytes Protect Tissue and Preserve Function after Spinal Cord Injury." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 24 (9): 2143–55. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3547-03.2004>.
- Fawcett, J. W., and R. A. Asher. 1999. "The Glial Scar and Central Nervous System Repair." *Brain Research Bulletin* 49 (6): 377–91.
- Fenyés, D. A., and P. A. Narayana. 1999. "In Vivo Diffusion Tensor Imaging of Rat Spinal Cord with Echo Planar Imaging." *Magnetic Resonance in Medicine* 42 (2): 300–306.
- Ford, J. C., D. B. Hackney, D. C. Alsop, H. Jara, P. M. Joseph, C. M. Hand, and P. Black. 1994. "MRI Characterization of Diffusion Coefficients in a Rat Spinal Cord Injury Model." *Magnetic Resonance in Medicine* 31 (5): 488–94.
- Fournely, Marion, Yvan Petit, Éric Wagnac, Jérôme Laurin, Virginie Callot, and Pierre-Jean Arnoux. 2018. "High-Speed Video Analysis Improves the Accuracy of Spinal Cord

- Compression Measurement in a Mouse Contusion Model.” *Journal of Neuroscience Methods* 293 (January): 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2017.09.007>.
- Fragata, Isabel, Marta Alves, Ana Luísa Papoila, Patrícia Ferreira, Ana Paiva Nunes, Nuno Canto Moreira, and Patrícia Canhão. 2018. “Prediction of Clinical Outcome in Subacute Subarachnoid Hemorrhage Using Diffusion Tensor Imaging.” *Journal of Neurosurgery*, April, 1–9. <https://doi.org/10.3171/2017.10.JNS171793>.
- Fraidakis, Matt, Thomas Klason, Henrich Cheng, Lars Olson, and Christian Spenger. 1998. “High-Resolution MRI of Intact and Transected Rat Spinal Cord.” *Experimental Neurology* 153 (2): 299–312. <https://doi.org/10.1006/exnr.1998.6897>.
- Franconi, F., L. Lemaire, L. Marescaux, P. Jallet, and J. J. Le Jeune. 2000. “In Vivo Quantitative Microimaging of Rat Spinal Cord at 7T.” *Magnetic Resonance in Medicine* 44 (6): 893–98.
- Friedli, Lucia, Ephron S. Rosenzweig, Quentin Barraud, Martin Schubert, Nadia Dominici, Lea Awai, Jessica L. Nielson, et al. 2015. “Pronounced Species Divergence in Corticospinal Tract Reorganization and Functional Recovery after Lateralized Spinal Cord Injury Favors Primates.” *Science Translational Medicine* 7 (302): 302ra134. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aac5811>.
- Fujikawa, Akira, Kazuhiro Tsuchiya, Sousuke Takeuchi, and Junichi Hachiya. 2004. “Diffusion-Weighted MR Imaging in Acute Spinal Cord Ischemia.” *European Radiology* 14 (11): 2076–78. <https://doi.org/10.1007/s00330-004-2284-6>.
- Fujita, Taku, Gentaro Kumagai, Xizhe Liu, Kanichiro Wada, Toshihiro Tanaka, Hitoshi Kudo, Toru Asari, et al. 2018. “Poor Motor-Function Recovery after Spinal-Cord Injury in Anxiety-Model Mice with Phospholipase C-Related Catalytically Inactive Protein Type 1 Knockout.” *Journal of Neurotrauma*, January. <https://doi.org/10.1089/neu.2017.5492>.
- Fuss, Johannes, Nada M.-B. Ben Abdallah, Miriam A. Vogt, Chadi Touma, Pier Giorgio Pacifici, Rupert Palme, Veit Witzemann, Rainer Hellweg, and Peter Gass. 2010. “Voluntary Exercise Induces Anxiety-like Behavior in Adult C57BL/6J Mice Correlating with Hippocampal Neurogenesis.” *Hippocampus* 20 (3): 364–76. <https://doi.org/10.1002/hipo.20634>.
- Gaviria, Manuel, Jean-Marie Bonny, Henri Haton, Beatrix Jean, Marisa Teigell, Jean-Pierre Renou, and Alain Privat. 2006. “Time Course of Acute Phase in Mouse Spinal Cord Injury Monitored by Ex Vivo Quantitative MRI.” *Neurobiology of Disease* 22 (3): 694–701. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2006.01.011>.
- Gaviria, Manuel, Henri Haton, Françoise Sandillon, and Alain Privat. 2002. “A Mouse Model of Acute Ischemic Spinal Cord Injury.” *Journal of Neurotrauma* 19 (2): 205–21. <https://doi.org/10.1089/08977150252806965>.
- Gerber, Yannick N., Alain Privat, and Florence E. Perrin. 2013. “Gacyclidine Improves the Survival and Reduces Motor Deficits in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis.” *Frontiers in Cellular Neuroscience* 7: 280. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00280>.
- Gerber, Yannick N., Jean-Charles Sabourin, Jean-Philippe Hugnot, and Florence E. Perrin. 2012. “Unlike Physical Exercise, Modified Environment Increases the Lifespan of SOD1G93A Mice However Both Conditions Induce Cellular Changes.” *PLoS One* 7 (9): e45503. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045503>.

- Ghosh, Mousumi, and Damien D. Pearse. 2014. "The Role of the Serotonergic System in Locomotor Recovery after Spinal Cord Injury." *Frontiers in Neural Circuits* 8: 151. <https://doi.org/10.3389/fncir.2014.00151>.
- Gimenez y Ribotta, M., D. Orsal, D. Feraboli-Lohnherr, and A. Privat. 1998. "Recovery of Locomotion Following Transplantation of Monoaminergic Neurons in the Spinal Cord of Paraplegic Rats." *Annals of the New York Academy of Sciences* 860 (November): 393–411.
- Gómez-Nicola, Diego, Nina L. Fransen, Stefano Suzzi, and V. Hugh Perry. 2013. "Regulation of Microglial Proliferation during Chronic Neurodegeneration." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 33 (6): 2481–93. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4440-12.2013>.
- Grant, Christopher V., Chin H. Wu, and Stanley J. Opella. 2010. "Probes for High Field Solid-State NMR of Lossy Biological Samples." *Journal of Magnetic Resonance (San Diego, Calif.: 1997)* 204 (2): 180–88. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2010.03.011>.
- Guilfoyle, David N., Victor V. Dyakin, Jacqueline O'Shea, Gaby S. Pell, and Joseph A. Helpert. 2003. "Quantitative Measurements of Proton Spin-Lattice (T1) and Spin-Spin (T2) Relaxation Times in the Mouse Brain at 7.0 T." *Magnetic Resonance in Medicine* 49 (3): 576–80. <https://doi.org/10.1002/mrm.10371>.
- Gulani, V., A.g. Webb, I.d. Duncan, and P.c. Lauterbur. 2001. "Apparent Diffusion Tensor Measurements in Myelin-Deficient Rat Spinal Cords." *Magnetic Resonance in Medicine* 45 (2): 191–95. [https://doi.org/10.1002/1522-2594\(200102\)45:2<191::AID-MRM1025>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/1522-2594(200102)45:2<191::AID-MRM1025>3.0.CO;2-9).
- Haacke. n.d. *Magnetic Resonance Imaging*. Ed. Wiley-Blackwell.
- Haas, Ria de, Frans G. Russel, and Jan A. Smeitink. 2016. "Gait Analysis in a Mouse Model Resembling Leigh Disease." *Behavioural Brain Research* 296 (Supplement C): 191–98. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.09.006>.
- Hackney, D. B., R. Asato, P. M. Joseph, M. J. Carvlin, J. T. McGrath, R. I. Grossman, E. A. Kassab, and D. DeSimone. 1986. "Hemorrhage and Edema in Acute Spinal Cord Compression: Demonstration by MR Imaging." *Radiology* 161 (2): 387–90. <https://doi.org/10.1148/radiology.161.2.3763906>.
- Hains, B. C., K. M. Johnson, D. J. McAdoo, M. J. Eaton, and C. E. Hulsebosch. 2001. "Engraftment of Serotonergic Precursors Enhances Locomotor Function and Attenuates Chronic Central Pain Behavior Following Spinal Hemisection Injury in the Rat." *Experimental Neurology* 171 (2): 361–78. <https://doi.org/10.1006/exnr.2001.7751>.
- Herculano-Houzel, Suzana. 2014. "The Glia/Neuron Ratio: How It Varies Uniformly across Brain Structures and Species and What That Means for Brain Physiology and Evolution." *Glia* 62 (9): 1377–91. <https://doi.org/10.1002/glia.22683>.
- Hidalgo. 2009. "Solenoid Coil for Mouse-Model MRI with a Clinical 3-Tesla Imager" *Rev. Mex. Fis.*: 55, 140–144.
- Inglis, B. A., E. L. Bossart, D. L. Buckley, E. D. Wirth, and T. H. Mareci. 2001. "Visualization of Neural Tissue Water Compartments Using Biexponential Diffusion Tensor MRI." *Magnetic Resonance in Medicine* 45 (4): 580–87.
- Inglis, B. A., D. Neubauer, L. Yang, D. Plant, T. H. Mareci, and D. Muir. 1999. "Diffusion Tensor MR Imaging and Comparative Histology of Glioma Engrafted in the Rat Spinal Cord." *AJNR. American Journal of Neuroradiology* 20 (4): 713–16.

- Inglis, B. A., L. Yang, E. D. Wirth, D. Plant, and T. H. Mareci. 1997. "Diffusion Anisotropy in Excised Normal Rat Spinal Cord Measured by NMR Microscopy." *Magnetic Resonance Imaging* 15 (4): 441–50.
- Jakeman, L. B., Z. Guan, P. Wei, R. Ponnappan, R. Dzwonczyk, P. G. Popovich, and B. T. Stokes. 2000. "Traumatic Spinal Cord Injury Produced by Controlled Contusion in Mouse." *Journal of Neurotrauma* 17 (4): 299–319. <https://doi.org/10.1089/neu.2000.17.299>.
- Jung, S., J. Aliberti, P. Graemmel, M. J. Sunshine, G. W. Kreutzberg, A. Sher, and D. R. Littman. 2000. "Analysis of Fractalkine Receptor CX(3)CR1 Function by Targeted Deletion and Green Fluorescent Protein Reporter Gene Insertion." *Molecular and Cellular Biology* 20 (11): 4106–14.
- Kameda, Takuya, Yoichi Kaneuchi, Miho Sekiguchi, and Shin-ichi Konno. 2017. "Measurement of Mechanical Withdrawal Thresholds and Gait Analysis Using the CatWalk Method in a Nucleus Pulposus-Applied Rodent Model." *Journal of Experimental Orthopaedics* 4 (September). <https://doi.org/10.1186/s40634-017-0105-5>.
- Kerr, Bradley J., and Samuel David. 2007. "Pain Behaviors after Spinal Cord Contusion Injury in Two Commonly Used Mouse Strains." *Experimental Neurology* 206 (2): 240–47. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.04.014>.
- Kettenmann, Helmut, Uwe-Karsten Hanisch, Mami Noda, and Alexei Verkhratsky. 2011. "Physiology of Microglia." *Physiological Reviews* 91 (2): 461–553. <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2010>.
- Kigerl, Kristina A., Violeta M. McGaughy, and Phillip G. Popovich. 2006. "Comparative Analysis of Lesion Development and Intraspinous Inflammation in Four Strains of Mice Following Spinal Contusion Injury." *The Journal of Comparative Neurology* 494 (4): 578–94. <https://doi.org/10.1002/cne.20827>.
- Kim, Ji Eun, Shuxin Li, Tadzia GrandPré, Dike Qiu, and Stephen M. Strittmatter. 2003. "Axon Regeneration in Young Adult Mice Lacking Nogo-A/B." *Neuron* 38 (2): 187–99.
- Kim, Jong-Hyeon, Kyoung-Jin Min, Wongi Seol, Ilo Jou, and Eun-Hye Joe. 2010. "Astrocytes in Injury States Rapidly Produce Anti-Inflammatory Factors and Attenuate Microglial Inflammatory Responses." *Journal of Neurochemistry* 115 (5): 1161–71. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.07004.x>.
- Kim, Joong H., David N. Loy, Qing Wang, Matthew D. Budde, Robert E. Schmidt, Kathryn Trinkaus, and Sheng-Kwei Song. 2010. "Diffusion Tensor Imaging at 3 Hours after Traumatic Spinal Cord Injury Predicts Long-Term Locomotor Recovery." *Journal of Neurotrauma* 27 (3): 587–98. <https://doi.org/10.1089/neu.2009.1063>.
- Kim, Joong Hee, David N. Loy, Hsiao-Fang Liang, Kathryn Trinkaus, Robert E. Schmidt, and Sheng-Kwei Song. 2007. "Noninvasive Diffusion Tensor Imaging of Evolving White Matter Pathology in a Mouse Model of Acute Spinal Cord Injury." *Magnetic Resonance in Medicine* 58 (2): 253–60. <https://doi.org/10.1002/mrm.21316>.
- Kumar, Rajesh, Alexa S. Chavez, Paul M. Macey, Mary A. Woo, and Ronald M. Harper. 2013. "Brain Axial and Radial Diffusivity Changes with Age and Gender in Healthy Adults." *Brain Research* 1512 (May): 22–36. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.03.028>.
- Kurpad, Shekar, Allan R. Martin, Lindsay A. Tetreault, Dena J. Fischer, Andrea C. Skelly, David Mikulis, Adam Flanders, et al. 2017. "Impact of Baseline Magnetic Resonance

- Imaging on Neurologic, Functional, and Safety Outcomes in Patients With Acute Traumatic Spinal Cord Injury.” *Global Spine Journal* 7 (3 Suppl): 151S–174S. <https://doi.org/10.1177/2192568217703666>.
- Le Corre, Marine, Harun N. Noristani, Nadine Mestre-Frances, Guillaume P. Saint-Martin, Christophe Coillot, Christophe Goze-Bac, Nicolas Lonjon, and Florence E. Perrin. 2017. “A Novel Translational Model of Spinal Cord Injury in Nonhuman Primate.” *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, November. <https://doi.org/10.1007/s13311-017-0589-9>.
- Lemon, Roger N., Peter A. Kirkwood, Marc A. Maier, Katsumi Nakajima, and Peter Nathan. 2004. “Direct and Indirect Pathways for Corticospinal Control of Upper Limb Motoneurons in the Primate.” *Progress in Brain Research* 143: 263–79. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(03\)43026-4](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(03)43026-4).
- Liu, X. Z., X. M. Xu, R. Hu, C. Du, S. X. Zhang, J. W. McDonald, H. X. Dong, et al. 1997. “Neuronal and Glial Apoptosis after Traumatic Spinal Cord Injury.” *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 17 (14): 5395–5406.
- Loher, T. J., C. L. Bassetti, K. O. Lövblad, F. P. Stepper, M. Sturzenegger, C. Kiefer, K. Nedeltchev, M. Arnold, L. Remonda, and G. Schroth. 2003. “Diffusion-Weighted MRI in Acute Spinal Cord Ischaemia.” *Neuroradiology* 45 (8): 557–61. <https://doi.org/10.1007/s00234-003-1023-z>.
- Lonjon, Nicolas, Emilie Chan-Seng, Vincent Costalat, Benoit Bonnafoux, Matthieu Vassal, and Julien Boetto. 2016. “Robot-Assisted Spine Surgery: Feasibility Study through a Prospective Case-Matched Analysis.” *European Spine Journal: Official Publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society* 25 (3): 947–55. <https://doi.org/10.1007/s00586-015-3758-8>.
- Lonjon, Nicolas, Monica Prieto, Henri Haton, Christian B. Brøchner, Luc Bauchet, Vincent Costalat, Alain Privat, Manuel Gaviria, and Florence E. Perrin. 2009. “Minimum Information about Animal Experiments: Supplier Is Also Important.” *Journal of Neuroscience Research* 87 (2): 403–7. <https://doi.org/10.1002/jnr.21871>.
- Ma, Manhong, Ping Wei, Tao Wei, Richard M. Ransohoff, and Lyn B. Jakeman. 2004. “Enhanced Axonal Growth into a Spinal Cord Contusion Injury Site in a Strain of Mouse (129X1/SvJ) with a Diminished Inflammatory Response.” *The Journal of Comparative Neurology* 474 (4): 469–86. <https://doi.org/10.1002/cne.20149>.
- Ma, Zhengwen, Yi Ping Zhang, Wei Liu, Guofeng Yan, Yao Li, Lisa B. E. Shields, Melissa Walker, et al. 2016. “A Controlled Spinal Cord Contusion for the Rhesus Macaque Monkey.” *Experimental Neurology* 279 (May): 261–73. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2016.02.008>.
- Maldonado-Bouchard, Sioui, Kelsey Peters, Sarah A. Woller, Behrouz Madahian, Usef Faghihi, Shivani Patel, Shameena Bake, and Michelle A. Hook. 2016. “Inflammation Is Increased with Anxiety- and Depression-like Signs in a Rat Model of Spinal Cord Injury.” *Brain, Behavior, and Immunity* 51 (January): 176–95. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.08.009>.
- Martin, D., J. Schoenen, P. Delrée, V. Gilson, B. Rogister, P. Leprince, A. Stevenaert, and G. Moonen. 1992. “Experimental Acute Traumatic Injury of the Adult Rat Spinal Cord by a Subdural Inflatable Balloon: Methodology, Behavioral Analysis, and

- Histopathology.” *Journal of Neuroscience Research* 32 (4): 539–50. <https://doi.org/10.1002/jnr.490320409>.
- Martínez-Muriana, Anna, Renzo Mancuso, Isaac Francos-Quijorna, Adrian Olmos-Alonso, Rosario Osta, V. Hugh Perry, Xavier Navarro, Diego Gomez-Nicola, and Ruben López-Vales. 2016. “CSF1R Blockade Slows the Progression of Amyotrophic Lateral Sclerosis by Reducing Microgliosis and Invasion of Macrophages into Peripheral Nerves.” *Scientific Reports* 6: 25663. <https://doi.org/10.1038/srep25663>.
- Matsuzawa, H., I. L. Kwee, and T. Nakada. 1995. “Magnetic Resonance Axonography of the Rat Spinal Cord: Postmortem Effects.” *Journal of Neurosurgery* 83 (6): 1023–28. <https://doi.org/10.3171/jns.1995.83.6.1023>.
- McDonald, John W., and Visar Belegu. 2006. “Demyelination and Remyelination after Spinal Cord Injury.” *Journal of Neurotrauma* 23 (3–4): 345–59. <https://doi.org/10.1089/neu.2006.23.345>.
- McGeer, P. L., E. G. McGeer, V. K. Singh, and W. H. Chase. 1974. “Choline Acetyltransferase Localization in the Central Nervous System by Immunohistochemistry.” *Brain Research* 81 (2): 373–79.
- McKinley, W. O., R. T. Seel, and J. T. Hardman. 1999. “Nontraumatic Spinal Cord Injury: Incidence, Epidemiology, and Functional Outcome.” *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation* 80 (6): 619–23.
- Meiboom, and Gill. 1958. “Modified Spin-Echo Method for Measuring Nuclear Relaxation Times.”
- Même, Sandra, Nicolas Joudiou, Frédéric Szeremeta, Joël Mispelter, Fanny Louat, Martine Decoville, Daniel Locker, and Jean-Claude Beloeil. 2013. “In Vivo Magnetic Resonance Microscopy of *Drosophila* at 9.4 T.” *Magnetic Resonance Imaging* 31 (1): 109–19. <https://doi.org/10.1016/j.mri.2012.06.019>.
- Menet, V., M. Prieto, A. Privat, and M. Giménez y Ribotta. 2003. “Axonal Plasticity and Functional Recovery after Spinal Cord Injury in Mice Deficient in Both Glial Fibrillary Acidic Protein and Vimentin Genes.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (15): 8999–9004. <https://doi.org/10.1073/pnas.1533187100>.
- Nakajima, K., M. A. Maier, P. A. Kirkwood, and R. N. Lemon. 2000. “Striking Differences in Transmission of Corticospinal Excitation to Upper Limb Motoneurons in Two Primate Species.” *Journal of Neurophysiology* 84 (2): 698–709. <https://doi.org/10.1152/jn.2000.84.2.698>.
- Narayana, P., D. Fenyes, and N. Zacharopoulos. 1999. “In Vivo Relaxation Times of Gray Matter and White Matter in Spinal Cord.” *Magnetic Resonance Imaging* 17 (4): 623–26.
- Nardone, Raffaele, Cristina Florea, Yvonne Höller, Francesco Brigo, Viviana Versace, Piergiorgio Lochner, Stefan Golaszewski, and Eugen Trinka. 2017. “Rodent, Large Animal and Non-Human Primate Models of Spinal Cord Injury.” *Zoology (Jena, Germany)* 123: 101–14. <https://doi.org/10.1016/j.zool.2017.06.004>.
- Nedelchev, Krassen, Thomas J. Loher, Frank Stepper, Marcel Arnold, Gerhard Schroth, Heinrich P. Mattle, and Matthias Sturzenegger. 2004. “Long-Term Outcome of Acute Spinal Cord Ischemia Syndrome.” *Stroke* 35 (2): 560–65. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000111598.78198.EC>.

- Nevo, U., E. Hauben, E. Yoles, E. Agranov, S. Akselrod, M. Schwartz, and M. Neeman. 2001. "Diffusion Anisotropy MRI for Quantitative Assessment of Recovery in Injured Rat Spinal Cord." *Magnetic Resonance in Medicine* 45 (1): 1–9.
- Nielsen, Kirsten, Dorte Brask, Gitte M. Knudsen, and Susana Aznar. 2006. "Immunodetection of the Serotonin Transporter Protein Is a More Valid Marker for Serotonergic Fibers than Serotonin." *Synapse (New York, N.Y.)* 59 (5): 270–76. <https://doi.org/10.1002/syn.20240>.
- Nikulina, E. M., J. A. Skriskaya, D. F. Avgustinovich, and N. K. Popova. 1995. "Dopaminergic Brain System in the Quaking Mutant Mouse." *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 50 (3): 333–37.
- Noctor, S. C., A. C. Flint, T. A. Weissman, R. S. Dammerman, and A. R. Kriegstein. 2001. "Neurons Derived from Radial Glial Cells Establish Radial Units in Neocortex." *Nature* 409 (6821): 714–20. <https://doi.org/10.1038/35055553>.
- Noristani, Harun N., Hassan Boukhaddaoui, Guillaume Saint-Martin, Pauline Auzer, Rahima Sidiboulouar, Nicolas Lonjon, Eric Alibert, et al. 2017. "A Combination of Ex Vivo Diffusion MRI and Multiphoton to Study Microglia/Monocytes Alterations after Spinal Cord Injury." *Frontiers in Aging Neuroscience* 9. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00230>.
- Noristani, Harun N., Yannick N. Gerber, Jean-Charles Sabourin, Marine Le Corre, Nicolas Lonjon, Nadine Mestre-Frances, H el ene E. Hirbec, and Florence E. Perrin. 2017. "RNA-Seq Analysis of Microglia Reveals Time-Dependent Activation of Specific Genetic Programs Following Spinal Cord Injury." *Frontiers in Molecular Neuroscience* 10 (April). <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00090>.
- Noristani, Harun N., Nicolas Lonjon, Ma ıda Cardoso, Marine Le Corre, Emilie Chan-Seng, Guillaume Captier, Alain Privat, Christophe Coillot, Christophe Goze-Bac, and Florence E. Perrin. 2015. "Correlation of in Vivo and Ex vivo 1H-MRI with Histology in Two Severities of Mouse Spinal Cord Injury." *Frontiers in Neuroanatomy* 9. <https://doi.org/10.3389/fnana.2015.00024>.
- Noristani, Harun Najib, Jean Charles Sabourin, Hassan Boukhaddaoui, Emilie Chan-Seng, Yannick Nicolas Gerber, and Florence Evelyne Perrin. 2016. "Spinal Cord Injury Induces Astroglial Conversion towards Neuronal Lineage." *Molecular Neurodegeneration* 11 (October). <https://doi.org/10.1186/s13024-016-0133-0>.
- Nout, Yvette S., Ephron S. Rosenzweig, John H. Brock, Sarah C. Strand, Rod Moseanko, Stephanie Hawbecker, Sharon Zdunowski, et al. 2012. "Animal Models of Neurologic Disorders: A Nonhuman Primate Model of Spinal Cord Injury." *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 9 (2): 380–92. <https://doi.org/10.1007/s13311-012-0114-0>.
- Oberheim, Nancy Ann, Takahiro Takano, Xiaoning Han, Wei He, Jane H. C. Lin, Fushun Wang, Qiwu Xu, et al. 2009. "Uniquely Hominid Features of Adult Human Astrocytes." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 29 (10): 3276–87. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4707-08.2009>.
- Olah, M., K. Biber, J. Vinet, and H. W. G. M. Boddeke. 2011. "Microglia Phenotype Diversity." *CNS & Neurological Disorders Drug Targets* 10 (1): 108–18.
- Olmos-Alonso, Adrian, Sjoerd T. T. Schettters, Sarmi Sri, Katharine Askew, Renzo Mancuso, Mariana Vargas-Caballero, Christian Holscher, V. Hugh Perry, and Diego Gomez-

- Nicola. 2016. "Pharmacological Targeting of CSF1R Inhibits Microglial Proliferation and Prevents the Progression of Alzheimer's-like Pathology." *Brain: A Journal of Neurology* 139 (Pt 3): 891–907. <https://doi.org/10.1093/brain/awv379>.
- Owens, Douglas K., Kathleen N. Lohr, David Atkins, Jonathan R. Treadwell, James T. Reston, Eric B. Bass, Stephanie Chang, and Mark Helfand. 2008. "Grading the Strength of a Body of Evidence When Comparing Medical Interventions." In *Methods Guide for Effectiveness and Comparative Effectiveness Reviews*. AHRQ Methods for Effective Health Care. Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality (US). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK47091/>.
- Papadopoulos, Stephen M., Nathan R. Selden, Douglas J. Quint, Nayna Patel, Brenda Gillespie, and Susan Grube. 2002. "Immediate Spinal Cord Decompression for Cervical Spinal Cord Injury: Feasibility and Outcome." *The Journal of Trauma* 52 (2): 323–32.
- Perrin, Florence E., Steve Lacroix, Marcelino Avilés-Trigueros, and Samuel David. 2005. "Involvement of Monocyte Chemoattractant Protein-1, Macrophage Inflammatory Protein-1alpha and Interleukin-1beta in Wallerian Degeneration." *Brain: A Journal of Neurology* 128 (Pt 4): 854–66. <https://doi.org/10.1093/brain/awh407>.
- Perry, V. Hugh. 2010. "Contribution of Systemic Inflammation to Chronic Neurodegeneration." *Acta Neuropathologica* 120 (3): 277–86. <https://doi.org/10.1007/s00401-010-0722-x>.
- Peter, Angela K., Claudia Crocini, and Leslie A. Leinwand. 2017. "Expanding Our Scientific Horizons: Utilization of Unique Model Organisms in Biological Research." *The EMBO Journal* 36 (16): 2311–14. <https://doi.org/10.15252/embj.201797640>.
- Philippens, Marielle E. P., Giulio Gambarota, Albert J. van der Kogel, and Arend Heerschap. 2009. "Radiation Effects in the Rat Spinal Cord: Evaluation with Apparent Diffusion Coefficient versus T2 at Serial MR Imaging." *Radiology* 250 (2): 387–97. <https://doi.org/10.1148/radiol.2502071374>.
- Popovich, P. G., Z. Guan, P. Wei, I. Huitinga, N. van Rooijen, and B. T. Stokes. 1999. "Depletion of Hematogenous Macrophages Promotes Partial Hindlimb Recovery and Neuroanatomical Repair after Experimental Spinal Cord Injury." *Experimental Neurology* 158 (2): 351–65. <https://doi.org/10.1006/exnr.1999.7118>.
- Pouw, M. H., A. M. van der Vliet, A. van Kampen, M. M. Thurnher, H. van de Meent, and A. J. F. Hosman. 2012. "Diffusion-Weighted MR Imaging within 24 H Post-Injury after Traumatic Spinal Cord Injury: A Qualitative Meta-Analysis between T2-Weighted Imaging and Diffusion-Weighted MR Imaging in 18 Patients." *Spinal Cord* 50 (6): 426–31. <https://doi.org/10.1038/sc.2011.168>.
- Rabenstein, Dallas L. 1984. "Sensitivity Enhancement by Signal Averaging in Pulsed/Fourier Transform NMR Spectroscopy." Research-article. October 1, 1984. <https://doi.org/10.1021/ed061p909>.
- Ransohoff, Richard M. 2016. "How Neuroinflammation Contributes to Neurodegeneration." *Science (New York, N.Y.)* 353 (6301): 777–83. <https://doi.org/10.1126/science.aag2590>.
- Rivlin, A. S., and C. H. Tator. 1978. "Effect of Duration of Acute Spinal Cord Compression in a New Acute Cord Injury Model in the Rat." *Surgical Neurology* 10 (1): 38–43.
- Ronen, Jacob, Diana Goldin, Vadim Bluvshtein, Beno Fishel, Ilana Gelernter, and Amiram Catz. 2004. "Survival after Nontraumatic Spinal Cord Lesions in Israel." *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation* 85 (9): 1499–1502.

- Rose, A. 1948. "The Sensitivity Performance of the Human Eye on an Absolute Scale." *Journal of the Optical Society of America* 38 (2): 196–208.
- Rosenzweig, Ephron S., Gregoire Courtine, Devin L. Jindrich, John H. Brock, Adam R. Ferguson, Sarah C. Strand, Yvette S. Nout, et al. 2010. "Extensive Spontaneous Plasticity of Corticospinal Projections after Primate Spinal Cord Injury." *Nature Neuroscience* 13 (12): 1505–10. <https://doi.org/10.1038/nn.2691>.
- Rowland, James W., Gregory W. J. Hawryluk, Brian Kwon, and Michael G. Fehlings. 2008. "Current Status of Acute Spinal Cord Injury Pathophysiology and Emerging Therapies: Promise on the Horizon." *Neurosurgical Focus* 25 (5): E2. <https://doi.org/10.3171/FOC.2008.25.11.E2>.
- Rustioni, A., N. L. Hayes, and S. O'Neill. 1979. "Dorsal Column Nuclei and Ascending Spinal Afferents in Macaques." *Brain: A Journal of Neurology* 102 (1): 95–125.
- Ryken, Timothy C., Mark N. Hadley, Beverly C. Walters, Bizhan Aarabi, Sanjay S. Dhall, Daniel E. Gelb, R. John Hurlbert, Curtis J. Rozzelle, and Nicholas Theodore. 2013. "Radiographic Assessment." *Neurosurgery* 72 Suppl 2 (March): 54–72. <https://doi.org/10.1227/NEU.0b013e318276edee>.
- Saadoun, S., and M. C. Papadopoulos. 2010. "Aquaporin-4 in Brain and Spinal Cord Oedema." *Neuroscience* 168 (4): 1036–46. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.08.019>.
- Saint-Martin, Guillaume, Harun Noristani, Maida Cardoso, Catteau, Matthias, Nicolas Lonjon, Christophe Coillot, Christophe Goze-Bac, and Florence E. Perrin. n.d. "Longitudinal MRI Analysis and Histological Characterization after Spinal Cord Injury in Two Mouse Strains with Different Functional Recovery: Gliosis as a Key Factor." *Journal of Comparative Neurology* Submitted.
- Sandner, Beatrice, Deepu R. Pillai, Robin M. Heidemann, Gerhard Schuierer, Matthias F. Mueller, Ulrich Bogdahn, Felix Schlachetzki, and Norbert Weidner. 2009. "In Vivo High-Resolution Imaging of the Injured Rat Spinal Cord Using a 3.0T Clinical MR Scanner." *Journal of Magnetic Resonance Imaging: JMRI* 29 (3): 725–30. <https://doi.org/10.1002/jmri.21477>.
- Schwartz, E. D., R. P. Yeziarski, P. M. Pattany, R. M. Quencer, and R. G. Weaver. 1999. "Diffusion-Weighted MR Imaging in a Rat Model of Syringomyelia after Excitotoxic Spinal Cord Injury." *AJNR. American Journal of Neuroradiology* 20 (8): 1422–28.
- Schwartz, Eric D., Emily T. Cooper, Yingli Fan, Abbas F. Jawad, Chih-Liang Chin, Jonathan Nissanov, and David B. Hackney. 2005. "MRI Diffusion Coefficients in Spinal Cord Correlate with Axon Morphometry." *Neuroreport* 16 (1): 73–76.
- Shapiro, Liza J., Whitney G. Cole, Jesse W. Young, David A. Raichlen, Scott R. Robinson, and Karen E. Adolph. 2014. "Human Quadrupeds, Primate Quadrupedalism, and Uner Tan Syndrome." *PloS One* 9 (7): e101758. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101758>.
- Simonen, Marjo, Vera Pedersen, Oliver Weinmann, Lisa Schnell, Armin Buss, Birgit Ledermann, Franziska Christ, Gilles Sansig, Herman van der Putten, and Martin E. Schwab. 2003. "Systemic Deletion of the Myelin-Associated Outgrowth Inhibitor Nogo-A Improves Regenerative and Plastic Responses after Spinal Cord Injury." *Neuron* 38 (2): 201–11.
- Song, Sheng-Kwei, Shu-Wei Sun, Won-Kyu Ju, Shiow-Jiuan Lin, Anne H. Cross, and Arthur H. Neufeld. 2003. "Diffusion Tensor Imaging Detects and Differentiates Axon and

- Myelin Degeneration in Mouse Optic Nerve after Retinal Ischemia.” *NeuroImage* 20 (3): 1714–22.
- Sotak, Christopher H. 2002. “The Role of Diffusion Tensor Imaging in the Evaluation of Ischemic Brain Injury - a Review.” *NMR in Biomedicine* 15 (7–8): 561–69. <https://doi.org/10.1002/nbm.786>.
- “Spinal Cord Injury: Facts and Figures at a Glance.” 2000. *The Journal of Spinal Cord Medicine* 23 (2): 153–55.
- Stamegna, Jean-Claude, Kevin Sadelli, Guy Escoffier, Stéphane D. Girard, Antoine D. Veron, Amandine Bonnet, Michel Khrestchatisky, Patrick Gauthier, and Francois Roman. 2018. “Grafts of Olfactory Stem Cells Restore Breathing and Motor Functions after a Rat Spinal Cord Injury.” *Journal of Neurotrauma*, January. <https://doi.org/10.1089/neu.2017.5383>.
- Steward, Oswald, Binhai Zheng, and Marc Tessier-Lavigne. 2003. “False Resurrections: Distinguishing Regenerated from Spared Axons in the Injured Central Nervous System.” *The Journal of Comparative Neurology* 459 (1): 1–8. <https://doi.org/10.1002/cne.10593>.
- Sun, Shu-Wei, Jeffrey J. Neil, and Sheng-Kwei Song. 2003. “Relative Indices of Water Diffusion Anisotropy Are Equivalent in Live and Formalin-Fixed Mouse Brains.” *Magnetic Resonance in Medicine* 50 (4): 743–48. <https://doi.org/10.1002/mrm.10605>.
- Takahara, Taro, Yutaka Imai, Tomohiro Yamashita, Seiei Yasuda, Seiji Nasu, and Marc Van Cauteren. 2004. “Diffusion Weighted Whole Body Imaging with Background Body Signal Suppression (DWIBS): Technical Improvement Using Free Breathing, STIR and High Resolution 3D Display.” *Radiation Medicine* 22 (4): 275–82.
- Tator, C. H. 1995. “Update on the Pathophysiology and Pathology of Acute Spinal Cord Injury.” *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)* 5 (4): 407–13.
- Thurnher, Majda M., and Roland Bammer. 2006. “Diffusion-Weighted MR Imaging (DWI) in Spinal Cord Ischemia.” *Neuroradiology* 48 (11): 795–801. <https://doi.org/10.1007/s00234-006-0130-z>.
- Vanický, I., L. Urdzíkova, K. Saganová, D. Cízková, and J. Gálik. 2001. “A Simple and Reproducible Model of Spinal Cord Injury Induced by Epidural Balloon Inflation in the Rat.” *Journal of Neurotrauma* 18 (12): 1399–1407. <https://doi.org/10.1089/08977150152725687>.
- Walters, Edgar T. 2014. “Neuroinflammatory Contributions to Pain after SCI: Roles for Central Glial Mechanisms and Nociceptor-Mediated Host Defense.” *Experimental Neurology* 258 (August): 48–61. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.02.001>.
- Wamil, A. W., B. D. Wamil, and C. G. Hellerqvist. 1998. “CM101-Mediated Recovery of Walking Ability in Adult Mice Paralyzed by Spinal Cord Injury.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (22): 13188–93.
- Wang-Leandro, A., M. K. Hobert, N. Alisaukaite, P. Dziallas, K. Rohn, V. M. Stein, and A. Tipold. 2017. “Spontaneous Acute and Chronic Spinal Cord Injuries in Paraplegic Dogs: A Comparative Study of in Vivo Diffusion Tensor Imaging.” *Spinal Cord*, August. <https://doi.org/10.1038/sc.2017.83>.
- Wanner, Ina B., Mark A. Anderson, Bingbing Song, Jaclynn Levine, Ana Fernandez, Zachary Gray-Thompson, Yan Ao, and Michael V. Sofroniew. 2013. “Glial Scar Borders Are Formed by Newly Proliferated, Elongated Astrocytes That Interact to Corral

- Inflammatory and Fibrotic Cells via STAT3-Dependent Mechanisms after Spinal Cord Injury.” *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 33 (31): 12870–86. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2121-13.2013>.
- Wetzel, Christiane, Jing Hu, Dieter Riethmacher, Anne Benckendorff, Lena Harder, Andreas Eilers, Rabih Moshourab, et al. 2007. “A Stomatin-Domain Protein Essential for Touch Sensation in the Mouse.” *Nature* 445 (7124): 206–9. <https://doi.org/10.1038/nature05394>.
- Xu, Junqian, Shu-Wei Sun, Robert T. Naismith, Abraham Z. Snyder, Anne H. Cross, and Sheng-Kwei Song. 2008. “Assessing Optic Nerve Pathology with Diffusion MRI: From Mouse to Human.” *NMR in Biomedicine* 21 (9): 928–40. <https://doi.org/10.1002/nbm.1307>.
- Xu, X. M., V. Guénard, N. Kleitman, and M. B. Bunge. 1995. “Axonal Regeneration into Schwann Cell-Seeded Guidance Channels Grafted into Transected Adult Rat Spinal Cord.” *The Journal of Comparative Neurology* 351 (1): 145–60. <https://doi.org/10.1002/cne.903510113>.
- Xu, X. M., S. X. Zhang, H. Li, P. Aebischer, and M. B. Bunge. 1999. “Regrowth of Axons into the Distal Spinal Cord through a Schwann-Cell-Seeded Mini-Channel Implanted into Hemisected Adult Rat Spinal Cord.” *The European Journal of Neuroscience* 11 (5): 1723–40.
- Zhang, K., and T. J. Sejnowski. 2000. “A Universal Scaling Law between Gray Matter and White Matter of Cerebral Cortex.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (10): 5621–26. <https://doi.org/10.1073/pnas.090504197>.
- Zheng, Binhai, Carole Ho, Shuxin Li, Hans Keirstead, Oswald Steward, and Marc Tessier-Lavigne. 2003. “Lack of Enhanced Spinal Regeneration in Nogo-Deficient Mice.” *Neuron* 38 (2): 213–24.

Abstract

Spinal cord injuries (SCI) affect 2.5 to 4 million people worldwide (40,000 in France). SCI induce sensory and motor symptoms leading to complete tetraplegia for the most severe lesions. Magnetic resonance imaging (MRI) is the only method used to follow patients with a spinal cord injury.

In this study, we have developed an *in vivo* MRI follow-up that accurately assess the progression of a lesion of the spinal cord in mice and non-human primates. The objective being to use the same techniques in humans and animals.

In particular, we showed that the CX3CR1^{+eGFP} and Aldh111-EGFP mice, that respectively express a fluorescent protein (eGFP) in microglia and astrocytes exhibit different functional recovery, and a better one is observed in CX3CR1^{+eGFP} mice. In order to identify whether these recoveries are associated with a differential evolution of the lesion, we performed a longitudinal follow-up using T2-weighted *in vivo* MRI. We also performed additional analyzes of spinal cord tissues using two *ex vivo* MRI (T2 and diffusion weighted MRI) as well as detailed histological analysis. Finally, we implemented our analysis with a longitudinal *in vivo* diffusion-weighted MRI follow-up of lesion evolution on an additional group of mice. *Ex* and *in vivo* T2-weighted MRI analyzes as well as histological assessment revealed no difference in lesion between the two mouse strains. Conversely, *ex* and *in vivo* diffusion-weighted MRI allowed identifying a lower lesion area at the epicenter in CX3CR1^{+eGFP} mice, the strain that recovers better.

We then evaluated the impact of a therapeutic strategy based on the modulation of the glial scar that plays a major role on the absence of spontaneous axonal regrowth after spinal cord injury. This modulation consists in a transient pharmacological depletion of microglia proliferation and its evaluation was carried out by an imaging and histological follow-up of treated and untreated animals. MRI monitoring did not permit to identify a difference in lesion extension and volume between groups. However, we observed a difference in parallel apparent diffusion coefficient (ADC//, diffusion gradient applied in axons direction) detected between the two groups, attesting of an effect of the treatment on the cellular organization after an SCI.

Finally, we used *in* and *ex vivo* MRI to characterize a new model of spinal cord injury in a non-human primate. We demonstrated that a lateral hemisection of the spinal cord in *Microcebus murinus* is a reproducible non-human primate model of SCI that could be further used to promote translational research.

We therefore characterized the use of *in* and *ex vivo* MRI to compare two mouse strains with different recovery after SCI. Similarly, the *in* and *ex vivo* follow-up of another species, *Microcebus murinus*, a nonhuman primate, allowed the characterization of a new SCI model. Finally, using MRI we detected a difference in parallel diffusion coefficient that was induced by the specific and transient depletion of microglia in a SCI context.

Résumé

Les lésions de la moelle épinière (LME) touchent 2.5 à 4 millions de personnes dans le monde (40 000 en France). Les LME induisent des symptômes sensitifs et moteurs conduisant, pour les lésions les plus sévères, à une tétraplégie complète. L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est la seule méthode permettant le suivi des patients ayant une lésion de la moelle épinière.

Dans cette étude, nous avons développé un suivi IRM *in vivo* qui permet d'identifier avec précision chez la souris et le primate non-humain la progression d'une lésion médullaire dans différents contextes. L'objectif étant d'utiliser les mêmes techniques chez l'Homme et chez l'animal.

En particulier, nous avons montré que les souris CX3CR1^{+eGFP} et Aldh111-EGFP qui expriment respectivement une protéine fluorescente (eGFP) dans les microglies et les astrocytes présentent une récupération fonctionnelle différente, les CX3CR1^{+eGFP} récupérant mieux. Afin d'identifier si ces récupérations sont associées à une évolution lésionnelle différentielle, nous avons effectué un suivi longitudinal en utilisant l'IRM pondérée T2 *in vivo*. Nous avons aussi réalisé des analyses approfondies des tissus de la moelle épinière en utilisant deux techniques d'IRM *ex vivo* (IRM en pondération T2 et en diffusion) ainsi qu'une analyse histologique détaillée. Enfin, nous avons effectué un suivi longitudinal de l'évolution de la lésion sur un groupe supplémentaire de souris en utilisant l'IRM pondérée en diffusion *in vivo*. Les analyses IRM pondérée en T2 *ex vivo*, *in vivo* et l'histologie n'ont révélé aucune différence au niveau lésionnel entre les deux souches de souris. Au contraire, les IRM pondérées diffusion en *ex vivo* et *in vivo* ont permis l'identification d'une plus faible surface lésionnelle à l'épicentre chez les souris CX3CR1^{+eGFP}, la souche ayant une meilleure récupération fonctionnelle.

Nous avons ensuite évalué l'impact d'une stratégie thérapeutique consistant en la modulation de la cicatrice gliale, principale limitation de la repousse axonale après une lésion médullaire. Cette modulation, consiste en une déplétion pharmacologique transitoire de la prolifération des microglies et son évaluation a été réalisée par un suivi en imagerie puis en histologie des animaux traités ou non. Le suivi IRM n'a pas permis d'identifier une différence entre les animaux traités et non-traités en terme d'extension et de volume lésionnel. Par contre, nous avons observé une différence dans le coefficient de diffusion apparent parallèle (ADC//, gradient de diffusion appliqué dans la direction des axones) entre les deux groupes, attestant de l'effet du traitement sur l'organisation cellulaire après une LME.

Enfin, nous avons utilisé l'IRM *in* et *ex vivo* pour caractériser un nouveau modèle de lésion de la moelle épinière sur un primate non-humain. Nous avons démontré qu'une hémisection latérale de la moelle épinière chez *Microcebus murinus* est un modèle reproductible de LME chez le primate non-humain qui pourrait être utilisé pour promouvoir une transition vers la recherche translationnelle.

Nous avons donc caractérisé l'utilisation de l'IRM *in vivo* et *ex vivo* dans la mise en place d'une comparaison entre deux souches de souris présentant une récupération différente après une LME. De même, le suivi *in* et *ex vivo* chez une autre espèce, *Microcebus murinus*, un primate non-humain, a permis la caractérisation d'un nouveau modèle de LME. Enfin, l'IRM a permis de détecter une différence de coefficient de diffusion provoquée par la déplétion spécifique et transitoire des microglies dans un contexte de LME.